

Carla Alexandra Araújo Leite

**ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS DO TECIDO
CAVERNOSO HUMANO: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E
IDENTIFICAÇÃO DE PURINOCEPTORES POR
IMUNOFLUORESCÊNCIA**

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá, sob a co-orientação da Professora Doutora Maria Adelina Costa e do Doutor Miguel Faria, e sob a co-orientação institucional do Professor Doutor Rúben Fernandes.

Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde

Porto, Setembro 2011

Dedicatória

Aos meus pais, Carlos Leite e Laurinda Campos.

Agradeço-lhes todo o amor, carinho, compreensão e paciência que me ofereceram.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá pela orientação, apoio e disponibilidade. Pela oportunidade de trabalhar neste laboratório e com esta equipa fantástica.

À Professora Doutora Maria Adelina Costa pela sua co-orientação. Pelos conhecimentos e ensinamentos que me transmitiu, que foram de elevada importância para a elaboração deste estudo. Pela paciência e dedicação, para me ajudar a resolver ‘aqueles’ problemas.

Ao Doutor Miguel Faria pela sua co-orientação. Pelos conhecimentos técnicos e científicos que me disponibilizou.

Ao Professor Rúben Fernandes pela sua co-orientação institucional. Pelos ensinamentos transmitidos ao longo do mestrado. Pelo apoio incondicional, porque sem si ‘tudo isto’ não teria sido possível.

À Doutora Fátima Ferreirinha pela disponibilidade e ajuda na realização das experiências de imunofluorescência. Por me dizer ‘és tão optimista’, mesmo quando eu sabia que nada estava bem.

Às minhas meninas e ao meu menino das células, ‘CellsTeam’: Carla Reis, Patrícia Marques, Mariana Certal e Diogo Paramos-de-Carvalho pelos momentos únicos naquele ‘nosso’ espaço. Pela ajuda, disponibilidade, apoio, companheirismo e amizade que sempre me deram ao longo deste tempo. Por me aturarem em dias bons e em dias maus, sempre com um sorriso na cara e com uma palavra de conforto.

Ao Ricardo Viais pelos momentos de conversa e cumplicidade, afinal somos ‘CavernoTeam’.

À D. Belmira e à D. Helena pelo apoio técnico diário.

Aos restantes elementos do laboratório pela amizade e disponibilidade que sempre me dedicaram. Obrigada a todos pelo apoio que deram ao longo deste tempo, ainda que não tenha mencionado o vosso nome, estão igualmente no meu coração.

A todos os meus Professores, Docentes do Mestrado de Tecnologia Bioquímica em Saúde da Escola Superior de Tecnologia de Saúde do Porto pelos ensinamentos e experiências que me transmitiram ao longo destes últimos dois anos.

Às minhas melhores amigas, ‘ninas’: Vera Adriana Miranda, Virgínia Carvalhais e Adelina Silva por tudo.

Verinha: Pelas nossas aventuras, pelas conversas, pela força e principalmente pela amizade incondicional.

Gi: Pelas nossas conversas, por aturares as minhas ‘malukices’, pela ajuda e por esta amizade incrível.

Lina: Pela presença incondicional na minha vida, pelas conversas, pelo apoio e pela cumplicidade de irmã.

A todos os meus amigos que de perto ou de longe sempre estiveram presentes, e tiveram sempre uma palavra de conforto para me dar.

O meu agradecimento especial aos meus pais, porque tudo o que sou e o que tenho devo-o a vocês. Não podia ter pais mais maravilhosos. As palavras que tenho para vos dizer nunca seriam suficientes para vos agradecer. Obrigada!

Epígrafe

*“Deus fez-nos perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo só depende da nossa vontade e perseverança”.*
(Albert Einstein)

Resumo

A adenosina é um nucleosídeo ubíquo responsável pela regulação da actividade celular através da activação de receptores existentes na membrana das células. A activação de alguns destes receptores intervém na regulação do tónus vascular do tecido cavernoso animal e humano. Estudos anteriores mostraram que os receptores da adenosina dos subtipos A_{2A} e A_{2B}, supostamente localizados no músculo liso e no endotélio vascular do tecido cavernoso humano, respectivamente, estão alterados do ponto de vista funcional em casos de disfunção eréctil vasculogénica (DEV). A DEV está associada a factores de risco, como a *Diabetes mellitus* do tipo 2, a hipertensão arterial, a hipercolesterolemia e hábitos tabágicos; estes factores estão também associados a alterações marcadas da função endotelial e, consequentemente, a um risco aumentado de doenças cardiovasculares. Sendo a adenosina um potente regulador do tónus vascular, admite-se que a sua participação seja fundamental na regulação da erecção peniana. É, assim, possível supor que a perda do efeito tónico de relaxamento nos vasos penianos da adenosina possa estar na origem da DEV.

Para melhor caracterizar o papel da adenosina no controlo da erecção peniana, este estudo procurou estabelecer um protocolo apropriado para o isolamento de células musculares lisas e endoteliais a partir de amostras de tecido cavernoso humano e de rato usando a técnica de explante e a de dissociação enzimática. A caracterização fenotípica das células foi realizada por imunofluorescência indirecta. Esta técnica também foi usada para identificar a presença de receptores purinérgicos nas células isoladas em cultura.

Comparativamente com a técnica de explante, a dissociação enzimática das células revelou-se mais eficaz para o isolamento e cultura das células do tecido cavernoso. Esta técnica apresentou um maior rendimento celular, gerando culturas com um elevado número de células viáveis e com um fenótipo bem definido num menor intervalo de tempo. Neste estudo confirmou-se a suspeita fundamentada por ensaios funcionais de que as células musculares lisas do tecido cavernoso humano expressam receptores da adenosina do subtipo A_{2A}. Esta marcação co-localiza com o marcador fenotípico de fibras musculares lisas, α -actina muscular lisa, exibindo um padrão de fluorescência característico.

Os resultados preliminares obtidos neste estudo permitem encarar com optimismo ensaios futuros destinados à caracterização de receptores e de enzimas envolvidas na sinalização purinérgica no tecido cavernoso humano e, até, iniciar estudos funcionais em célula única (*e.g.* “single-cell calcium imaging”) para avaliar possíveis alterações funcionais com significado terapêutico em doentes portadores de DEV resistente a fármacos.

Palavras-Chave: Disfunção erétil vasculogénica; Tecido cavernoso; Receptores da adenosina; Culturas celulares.

Abstract

Adenosine is a nucleoside responsible for the regulation of cellular function via the activation of membrane-bound receptors. Adenosine has important hemodynamic effects through the activation of several subtype-specific receptors on vascular beds. Previous studies indicate that adenosine receptors of the A_{2A} and A_{2B} subtypes localized, respectively, on smooth muscle fibres and vascular endothelium of the cavernous tissue are functionally altered in patients with vasculogenic erectile dysfunction (VED). VED is associated with high risk factors for cardiovascular diseases, such as type 2 diabetes mellitus, arterial hypertension, hypercholesterolemia and heavy smoking habits. Coincidentally, these factors are also associated with endothelial dysfunction, and consequently to increased cardiovascular disease risk. Once adenosine is a potent regulator of vascular tonus, the nucleoside seems to be essential to the regulation of penile erection, indicating that this molecule may have a tonic effect on penile blood vessels, whose failure is the basis for VED.

To better characterize adenosine effects to control penile erection, we sought to establish an appropriate protocol to isolate smooth muscle cells and endothelial cells from the cavernous tissue of both humans and rats. To this end, we compared the explant technique and an enzymatic dissociation technique. Phenotypic characterization of the cells was performed by indirect immunofluorescence experiments. This technique was also performed to identify purinergic receptors present in cultured cells.

The enzymatic dissociation technique revealed to be more efficient as compared to the explant technique. It showed a greater cellular yield, with a higher number of viable cells present in culture in a shorter period of time. Smooth muscle cells and endothelial cells of the human cavernous tissue were identified by indirect immunofluorescence using anti-msSMA-FITC and anti-msFVIII (von Willebrand), respectively. The expression of adenosine A_{2A} receptors was confirmed in smooth muscle cells in culture; co-localization of anti-msSMA-FITC and anti-rbA_{2A} labeling was found in these cells.

Preliminary data obtained in this study allows facing with optimism future assays designed at characterizing the receptors and the enzymatic pathways involved in purinergic signaling in the human corpus cavernosum e, even, conducting studies of single-cell

calcium imaging to investigate new pharmacological targets to tackle drug-resistant erectile dysfunction.

Key-Words: Vasculogenic erectile dysfunction; Cavernous tissue; Adenosine receptors; Cell cultures.

Índice Geral

Introdução	1
1. Objectivos	1
 Capítulo I – Estado da Arte	 3
1. (Dis)Função Erétil	5
2. Anatomia Peniana	9
3. Cultura de Células	12
<i>i.</i> Tipos de Culturas Celulares	13
<i>ii.</i> Método de obtenção de culturas primárias	14
<i>iii.</i> Características e Morfologia das Culturas	15
<i>iv.</i> Condições de cultura	16
<i>v.</i> Avaliação das culturas	18
<i>vi.</i> Contaminações nas culturas celulares	18
4. Transmissão Purinérgica	19
<i>i.</i> Adenosina	20
<i>ii.</i> Receptores Purinérgicos	21
<i>iii.</i> Papel da Adenosina na (Dis)função erétil	23
 Capítulo II – Material e Métodos	 25
1. Amostras de Tecido Cavernoso e Considerações Éticas	27
<i>i.</i> Isolamento do Tecido Cavernoso	27
<i>ii.</i> Processamento das Amostras de Tecido	28
2. Cultura de Células de Músculo Liso	28
<i>i.</i> Cultura pela Técnica de Explante	28

ii. Cultura pela Técnica de Dissociação Enzimática _____	29
iii. Manutenção das Culturas _____	29
3. Cultura de Células Endoteliais pela Técnica de Dissociação Enzimática ____	30
4. Identificação Fenotípica das Células de Tecido Cavernoso e da Expressão dos Receptores Purinérgicos _____	30
i. Tripsinização das Células _____	30
ii. Imunohistoquímica _____	32
 Capítulo III – Resultados _____	 37
1. Optimização da técnica de cultura de células de tecido cavernoso humano e de rato <i>in vitro</i> _____	40
i. Cultura de células de músculo liso de tecido cavernoso _____	40
ii. Cultura de células endoteliais de tecido cavernoso _____	44
iii. Caracterização das células do tecido cavernoso humano por imunofluorescência indirecta _____	46
 Capítulo IV – Discussão _____	 53
 Conclusão _____	 59
1. Perspectivas Futuras _____	59
 Referências Bibliográficas _____	 61

Índice de Abreviaturas, Acrónimos e Sinais

Ab	Anticorpo
ACh	Acetilcolina
ACh-[³H]	Acetilcolina Tritiada
ADA	Adenosina Desaminase
ADK	Adenosina Cinase
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina 5'-Difosfato
Ag	Antigénio
AMP	Adenosina 5'-Monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina 5'-Trifosfato
BSA	Albumina do soro bovino
Ca²⁺	Cálcio
CCH	Corpos Cavernosos Humanos
CO₂	Dióxido de Carbono
DE	Disfunção Erétil
DEV	Disfunção Erétil Vasclogénica
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
ENT	Transportadores equilibrativos de nucleósidos
GMPc	Guanosina Monofostato cíclico
IP₃	Trifosfato de Inositol
K⁺	Potássio

Isolamento e Cultura de Células do Tecido Cavernoso Humano:
Caracterização Fenotípica e Identificação de Purinoceptores por Imunofluorescência

NO	Monóxido de Azoto
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldeído
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
REM	Rapid Eye Movement
SBF	Soro Bovino Fetal
SMA	Smooth Muscle Actin
UDP	Difosfato de Uridina
UTP	Trifosfato de Uridina

Índice de Tabelas

Tabela I: Anticorpos primários utilizados na marcação por imunofluorescência indirecta._____	34
Tabela II: Anticorpos secundários utilizados na marcação por imunofluorescência indirecta._____	34
Tabela III: Lasers utilizados na observação por imunofluorescência indirecta._____	35
Tabela IV: Morfologia das células de tecido cavernoso de rato cultivadas <i>in vitro</i> , em meio de cultura DMEM e, descrição das características adquiridas pela cultura realizada pela técnica de explante, observada por microscopia óptica._____	41
Tabela V: Morfologia das células de tecido cavernoso de humano cultivadas <i>in vitro</i> , em meio de cultura M199 e, descrição das características adquiridas pela cultura realizada pela técnica de dissociação, observada por microscopia óptica._____	43
Tabela VI: Morfologia das células de tecido cavernoso humano cultivadas <i>in vitro</i> , em meio de cultura ECGM, e descrição das características adquiridas pela cultura realizada pela técnica de dissociação enzimática, observadas por microscopia óptica._	45

Índice de Figuras

Figura I: Activação do sistema não-adrenérgico e não-colinérgico desencadeia erecção peniana através da formação de NO.	6
Figura II: Anatomia do pénis humano em corte transversal, demonstrando o estado erétil e o estado flácido do mesmo.	10
Figura III: Efeito purinérgico na junção neuromuscular, exibindo a síntese, armazenamento, libertação e inactivação do ATP.	20
Figura IV: Estrutura química da Adenosina.	21
Figura V: Tabela com as características dos receptores de purinas e pirimidinas.	22
Figura VI: Câmara de <i>Neubauer</i> e esquema de contagem de células.	31
Figura VII: Placa <i>ChamberSlide</i> para realização de imunofluorescência indirecta de células.	32
Figura VIII: Representação esquemática do processo de imunofluorescência indirecta.	33
Figura IX: Microscópio Confocal Olympus FuoView FV1000.	35
Figura X: Células de tecido cavernoso de rato marcadas com anticorpo específico anti-msSMA (verde) observadas por microscopia confocal.	47
Figura XI: Células de tecido cavernoso de humano marcadas com anticorpo específico anti-msSMA (verde) observadas por microscopia confocal.	48
Figura XII: Células de tecido cavernoso humano marcadas com anticorpo específico anti-msFVIII (vermelho) observadas por microscopia confocal.	49

Figura XIII: Células de tecido cavernoso de rato marcadas com anticorpo específico anti-msSMA (verde) e com anticorpo contra os receptores A_{2A} (vermelho) observadas por microscopia confocal._____ 50

Figura XIV: Células de tecido cavernoso humano marcadas com anticorpo específico anti-msSMA (marcação verde) e com anticorpo específico contra os receptores $P2Y_1$ (marcação vermelha) observadas por microscopia confocal._____ 51

Introdução

Para que haja uma função erétil normal é necessário (1) aumentar o fluxo sanguíneo através das artérias cavernosas, (2) reduzir o efluxo do sangue pelas veias do corpo cavernoso, e (3) promover o relaxamento do músculo liso do tecido cavernoso. Este último processo depende da abertura dos sinusóides para permitir a acumulação de sangue no interior dos corpos cavernosos. Apesar dos mecanismos que regulam o influxo arterial e o efluxo venoso serem bem conhecidos, pouca importância se tem dado ao músculo liso dos corpos cavernosos humanos neste processo. A resposta muscular lisa pode ser mais ou menos complexa dependendo das características do órgão irrigado e do efeito integrado de factores nervosos, endócrinos, autócrinos e parácrinos, por exemplo gerados nas células endoteliais adjacentes. A camada muscular lisa vascular é formada por uma rede heterogénea de fibras musculares e não-fibras musculares e não-musculares separadas por espaços extracelulares, cuja complexidade pode afectar a difusão e acessibilidade dos mediadores endógenos e dos fármacos a testar.

Este obstáculo pode ser evitado usando culturas celulares homogéneas. Para além disso, a utilização deste modelo simplificado permite (1) avaliar o efeito dos vários factores intervenientes no crescimento e diferenciação das culturas celulares e (2) realizar ensaios para identificar os receptores e os segundos mensageiros intracelulares (e.g. Ca^{2+} , AMP cíclico, fosfatos de inositol) envolvidos nas respostas aos diversos agentes vasomotores.

1. Objectivos

Para caracterizar melhor os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na acção da adenosina e dos seus análogos estáveis no controlo da função erétil no homem, serão realizadas experiências usando culturas celulares homogéneas de células endoteliais e de músculo liso vascular, isoladas a partir de corpos cavernosos retirados de indivíduos controlo e de doentes portadores de disfunção erétil vasculogénica (DEV) fármaco-resistente aquando da inserção de próteses penianas. O recurso a técnicas de

imunocitoquímica permitirá confirmar a presença dos receptores A_{2A} e A_{2B} da adenosina no músculo liso (co-localização com alfa-actina) e no endotélio (co-localização com o anticorpo anti-factor de von Willebrand) do corpo cavernoso humano.

O domínio de técnicas de isolamento e cultura celular a partir do tecido cavernoso humano permitirão, ainda, no futuro investigar o papel dos agonistas e antagonistas selectivos dos receptores da adenosina na proliferação e diferenciação das células endoteliais e dos miócitos em cultura, avaliando a síntese de DNA (por incorporação de [³H]-timidina) e a viabilidade / proliferação celular (kit Live/Dead, método MTT, produção de ATP por bioluminescência). Existe um outro objectivo a longo prazo que surge na sequência do uso de culturas celulares primárias derivadas do tecido cavernoso humano. Trata-se da realização de ensaios para avaliar a dinâmica do Ca²⁺ intracelular em célula única por microscopia com sonda fluorescente (Fura-2 AM), sabendo-se que a alteração dos níveis intracelulares deste íão é o mecanismo principal através do qual a tensão é regulada na fibra muscular lisa. As modificações da concentração intracelular de Ca²⁺ são, também, fundamentais nos processos de sinalização do endotélio vascular a diversos mediadores endógenos e a fármacos usados na clínica. Em terceiro lugar, existe a possibilidade de investigar a expressão e funcionamento das enzimas responsáveis pela formação/metabolismo de purinas no meio extracelular nas células do corpo cavernoso humano, muito facilitada pela colaboração estabelecida com a equipa do Professor Jean Sévigny (Quebec, Canadá) que desenvolveu anticorpos específicos contra diversas ectonucleotidases (NTPDases 1,2,3,8 e 5'-nucleotidase) humanas e que ainda não estão disponíveis comercialmente. Deste modo se comprova a relevância deste projecto desenhado para desenvolver e implementar uma técnica de rotina destinada a cultivar células das várias linhagens que compõem o tecido cavernoso humano para avaliação da expressão de proteínas e funcionamento celular num modelo experimental simplificado.

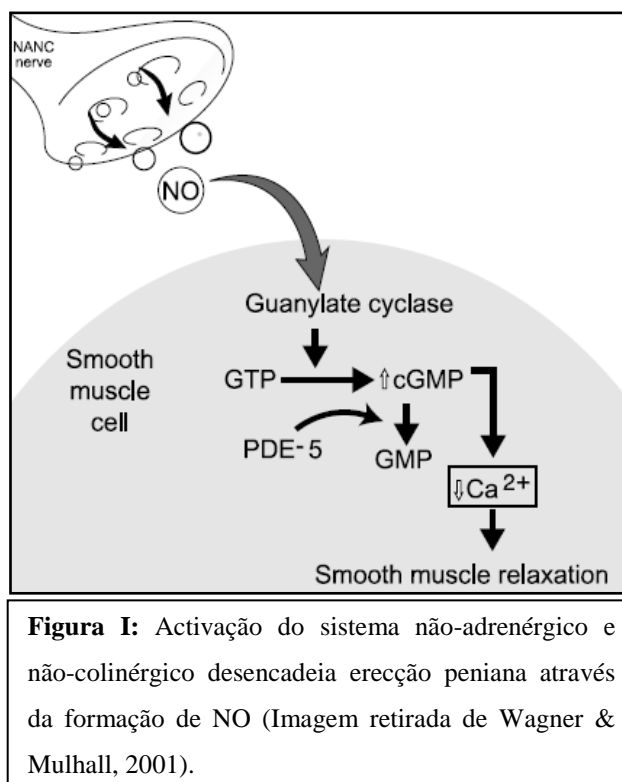
Capítulo I – Estado da Arte

1. (Dis)Função Erétil

A **erecção peniana** é um processo neuromuscular modulado por estímulos que chegam ao cérebro através do sistema nervoso, e é influenciada por aspectos orgânicos, hormonais, emocionais, comportamentais, entre outros. O pénis contém estruturas vasculares (sinusóides), que promovem a erecção e a rigidez peniana quando se ingurgitam com sangue. Existem três tipos de erecção: 1) erecção psicogénica, que resulta da estimulação audiovisual ou do imaginário e o cérebro modula os impulsos que chegam aos centros espinais para activar o processo de erecção; 2) erecção reflexogénica, produzida por estimulação táctil dos órgãos genitais, quando os impulsos atingem os centros espinais, uns seguem para o tracto ascendente, causando percepção sensorial, enquanto outros activam núcleos autossómicos, que enviam as mensagens através dos nervos cavernosos para induzir a erecção; 3) erecção nocturna, ocorre principalmente na fase de sono REM ('rapid eye movement') e é desencadeada por um mecanismo de activação diferencial dos receptores adrenérgicos, colinérgicos e serotoninérgicos durante o sono (Martinez-Salamanca *et al.*, 2010).

As diferentes estruturas intervenientes no processo de erecção são inervadas por terminações nervosas simpáticas, parassimpáticas e somáticas. Durante o estímulo sexual, os impulsos nervosos causam a libertação de neurotransmissores dos terminais do nervo cavernoso e o estímulo mecânico em resposta às variações do fluxo sanguíneo causam a libertação de factores de relaxamento a partir das células endoteliais do pénis, conduzindo ao relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos. Os nervos penianos são classificados segundo o neurotransmissor que produzem/libertam em: adrenérgicos (libertam noradrenalina), colinérgicos (libertam acetilcolina) e não-adrenérgicos ou não-colinérgicos (capazes de libertar neuropéptidos, ATP, entre outros neurotransmissores) (Anderson & Wagner, 1995; Anderson, 2001). O ATP e alguns neuropéptidos podem ainda ser co-libertados com os neurotransmissores clássicos, noradrenalina e acetilcolina, a partir dos terminais nervosos adrenérgicos e colinérgicos, respectivamente. A estimulação da libertação de acetilcolina pelos terminais nervosos parassimpáticos favorece a libertação de monóxido de azoto (NO) a partir do endotélio vascular e, consequentemente, o relaxamento dos sinusóides penianos. O NO libertado activa a enzima citoplasmática, guanilato ciclase, que promove a formação de GMPc (guanosina monofostato cíclico)

(Figura I) (Burnstock, 2006a). Níveis elevados de GMPc promovem a redução da concentração de cálcio (Ca^{2+}) nas células de músculo liso, bem como o aprisionamento de Ca^{2+} intracelular no retículo sarcoplasmático, o que induz o relaxamento muscular. Este mecanismo causa um maior e mais rápido aporte de sangue (vasodilatação) ao pênis, proporcionando rigidez e erecção (Burnett, 1995).



Ao mesmo tempo, o relaxamento do músculo liso trabecular aumenta a complacência dos sinusóides, facilitando o enchimento rápido e a expansão do sistema sinusoidal. A compressão do plexo venular subtúnica, compreendido entre as trabéculas e a túnica albugínea, oclui de forma quase total o efluxo venoso do sangue contido nos corpos cavernosos (Lue, 2000; Dean & Lue, 2005).

No fim do acto sexual, a entrada e saída de sangue dos músculos isquiocavernosos pode parar temporariamente, fenómeno designado por detumescência, uma vez que há uma interrupção da libertação de neurotransmissores, degradação de segundos mensageiros por fosfodiesterases, e uma descarga simpática resultante da ejaculação. O fenómeno da detumescência caracteriza-se em três fases: 1) aumento da pressão intracorpórea transitória, indicando o início da contracção do músculo liso num sistema venoso fechado; 2) diminuição da pressão lenta, levando a uma reabertura lenta dos canais venosos, com

recomeço do nível basal do fluxo arterial; 3) diminuição da pressão rápida, com a capacidade de saída venosa totalmente restaurada (Bosch *et al.*, 1991; Martinez-Salamanca *et al.*, 2010). Assim, a contracção do músculo liso trabecular reabre os canais venosos e o sangue aprisionado é então expulso, retomando o estágio normal de flacidez. O efluxo de Ca^{2+} diminui, aumentando a drenagem venosa e diminuindo a pressão intracavernosa. O estado de flacidez é mantido pela acumulação de Ca^{2+} intracelular, originada principalmente pela estimulação dos receptores adrenérgicos α_1 pela noradrenalina. A endotelina, $\text{PGF}_{2\alpha}$ e o tromboxano A2, sintetizados no tecido cavernoso, também parecem estar envolvidos no mecanismo de manutenção da flacidez (Christ *et al.*, 1995).

Sendo assim, é o tónus muscular liso que determina o estado da estrutura peniana, entre o flácido e o erecto, uma vez que a erecção envolve o relaxamento sinusoidal, a dilatação arterial e a compressão venosa.

A **disfunção erétil** pode ser definida como a incapacidade crónica de conseguir e manter uma erecção peniana satisfatória por um período de tempo adequado ao estabelecimento de uma relação sexual. A disfunção erétil surge quando um ou mais aspectos responsáveis pela erecção peniana falham (NIH, 1993). Podem ser causas da disfunção erétil as seguintes (Halls *et al.*, 2009):

- Inadequado estímulo sexual ou falha de sensibilidade;
- Transtornos emocionais;
- Alteração da integridade das vias nervosas, que transmitem o estímulo do cérebro ao pénis;
- Inadequado funcionamento dos sinusóides e vasos sanguíneos do pénis.

A disfunção erétil afecta 13% da população masculina portuguesa, segundo o estudo *Episex-pt* promovido pela Sociedade Portuguesa de Andrologia em 2006. A etiologia da disfunção erétil pode ser vasculogénica, neurogénica, endocrinológica ou psicogénica. Estudos sugerem que a disfunção erétil vasculogénica é uma consequência natural do processo de envelhecimento, no entanto, a sua gravidade está fortemente associada a factores de risco cardiovasculares, como obesidade, *Diabetes mellitus* do tipo

2, hipertensão arterial, hipercolestoremia, hiper/dislipidemia e hábitos tabágicos, assim como a deficiência androgénica (Odriozola *et al.*, 2010). A perda da integridade funcional do endotélio vascular modifica a sua capacidade de resposta a alterações homeostáticas locais e, a factores parácrinos e autócrinos, denominando-se por disfunção endotelial (Galiano *et al.*, 2010).

A disfunção endotelial tem por base a aterogénese, que está na origem da fisiopatologia de doença cardiovascular. A disfunção endotelial caracteriza-se maioritariamente por uma deficiente síntese, libertação e actividade do NO a partir do endotélio vascular, assim como por uma incapacidade de manter a erecção peniana, que culmina com uma disfunção erétil vasculogénica (Burnett, 1997; Tejada *et al.*, 2004). O endotélio vascular do pénis tem um papel fundamental na modulação do tónus vascular e do fluxo de sangue peniano, em resposta a estímulos hormonais, nervosos e mecânicos, resultado de uma diminuição da resposta a mediadores de vasodilatação e/ou de um aumento da sensibilidade a vários vasoconstritores. Assim sendo, a disfunção endotelial e a consequente redução da libertação de óxido nítrico do endotélio durante a actividade sexual é um importante factor da fisiopatologia da disfunção erétil vasculogénica (DEV) (Odriozola *et al.*, 2010). O agravamento da disfunção erétil também pode ser causado pela ausência de estimulação sexual regular ou de erecções nocturnas que podem resultar num fornecimento insuficiente de oxigénio ao pénis, e consequentemente, aumentar a fibrose tecidular e diminuir a consistência do músculo liso (Terradas *et al.*, 2001). Um bom mecanismo no tratamento da disfunção erétil vasculogénica será reabilitar a disfunção endotelial (Sommer & Schulze, 2005).

Os factores de risco comumente associados a patologia vascular têm sido encontrados em pacientes com disfunção erétil vasculogénica. É de realçar que a disfunção erétil, normalmente, precede uma situação de doença coronária (2 a 3 anos), e pode funcionar como um marcador precoce da propensão para isquemia do miocárdio (Montorsi *et al.*, 2005; Montorsi *et al.*, 2006; Vardi *et al.*, 2009). Situações de ansiedade contínuas levam a um aumento do tónus adrenérgico, inibindo a capacidade erétil e facilitam a produção de prolactina, que no homem causa impotência sexual. Muitas vezes, o estilo de vida causa níveis elevados de ansiedade, e para os atenuar o homem incorre em hábitos tóxicos, como alimentação pouco saudável, consumo de álcool, abuso de drogas

lícitas e ilícitas (e.g. tabaco, cocaína) (Santamaria, 2010). Cada cigarro produz, por efeito da nicotina, um vasoespasma de 30 minutos. Se durante um dia forem consumidos 30 cigarros as artérias não terão descanso, permanecendo em contracção a maior parte do dia. As erecções nocturnas são essenciais para a manutenção do endotélio peniano. Estudos demonstram que o elevado consumo de tabaco está inversamente relacionado com o número de erecções durante o sono (Hirshkowitz *et al.*, 1992). Quanto ao consumo de álcool, a elevação dos seus níveis no sangue diminui a capacidade erétil e retarda a ejaculação. O álcool produz alterações na neurotransmissão e desequilíbrios hormonais, uma vez que o etanol e o acetilaldeído produzem efeitos tóxicos nas células de *Leyding* e, a longo prazo, promove a redução do número de neurónios no hipotálamo, com a consequente diminuição de resposta sexual (Steenbergen, 1993; Santamaria, 2010).

A *Diabetes mellitus* do tipo 2 (DM2) constitui o maior factor de risco para o desenvolvimento de disfunção erétil, exacerbada pela idade superior a 50 anos e pela evolução da patologia. Elevados níveis de glicose no sangue causam danos nos nervos e nas artérias. A DM2 não controlada pode levar a outros problemas de saúde como perda de visão, nefropatia, neuropatia e disfunção erétil (Albersen *et al.*, 2011; Thorve *et al.*, 2011). Estudos demonstram que 3 em cada 5 homens com DM2 desenvolvem disfunção erétil 6 meses a 10 anos mais cedo que os homens sem esta patologia (Giuliano *et al.*, 2010). A disfunção erétil em homens com DM2 está, muitas vezes, associado a uma hipercontracção do músculo liso peniano, a uma disfunção endotelial e a alterações no metabolismo do colagénio e da elastina, manifestando sintomas de disfunção veno-oclusiva (Jesmin *et al.*, 2003; Chitale, 2009).

2. Anatomia Peniana

O pénis humano é composto por três estruturas principais, três cilindros totalmente separados: corpo esponjoso, que contém a uretra, e dois corpos cavernosos (figura II), que são responsáveis pela erecção quando se preenchem com sangue proveniente das artérias cavernosas.

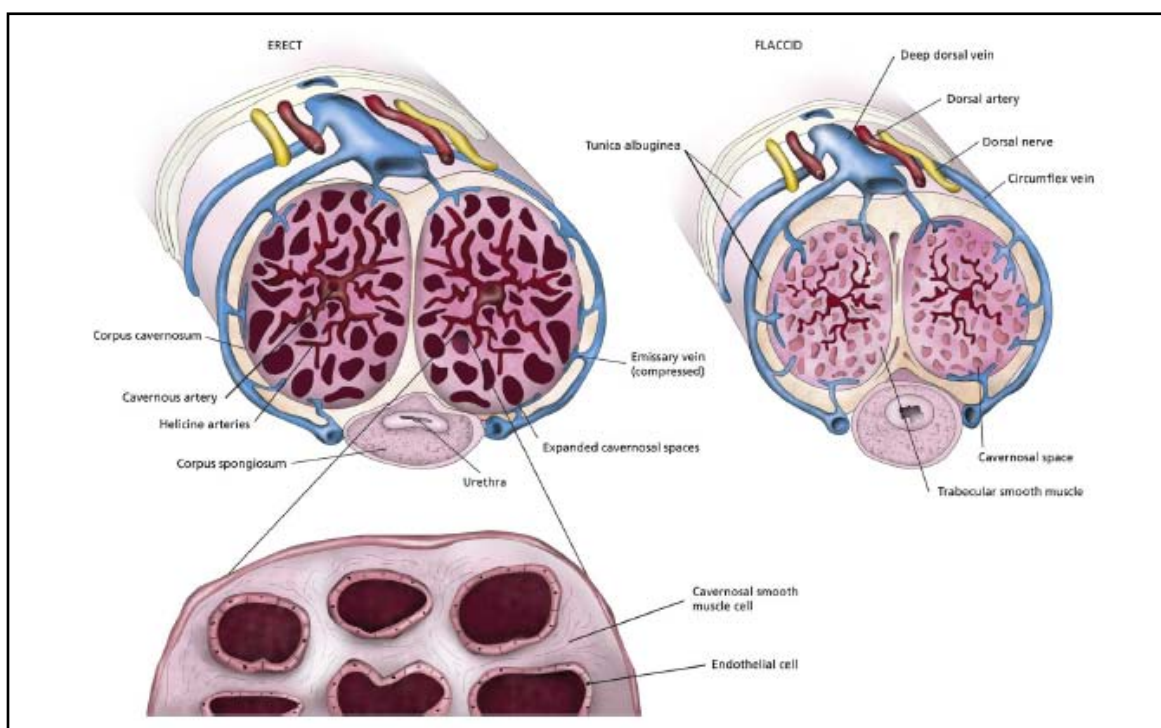


Figura II: Anatomia do pênis humano em corte transversal, demonstrando o estado erétil e o estado flácido do mesmo (Imagem retirada de Ritchie & Sullivan, 2011).

O corpo esponjoso está envolvido por uma fina camada de tecido muito sensível e, encontra-se no sulco criado pelos corpos cavernosos. Na extremidade mais próxima do corpo, a estrutura vai aumentando de tamanho até que forma o bolbo. Na extremidade oposta do pênis, está a estrutura conhecida por glândula revestida pelo prepúcio (Hsu *et al.*, 2004). Durante a ereção, o aumento do fluxo de sangue nas estruturas penianas é semelhante, no entanto, a pressão do mesmo no corpo esponjoso e na glândula é apenas um terço da metade registrada nos corpos cavernosos, devido ao revestimento tuncal que garante o mínimo de oclusão venosa. A compressão parcial das veias profundas, dorsais e circunflexas, entre a Faixa de Buck e a ingurgitação dos corpos cavernosos, contribuem para a tumescência glandular (Martinez-Salamanca, 2010).

Na rigidez peniana, os músculos isquiocavernosos e bulbocavernosos forçam a compressão do corpo esponjoso e das veias penianas, resultando num ingurgitamento e num aumento da pressão na glândula e no corpo esponjoso (Martinez-Salamanca, 2010).

Cada um dos corpos cavernosos está revestido por uma camada de tecido muito resistente, a túnica albugínea. Os corpos cavernosos são extremamente vascularizados e estão separados entre si por um septo incompleto, ancorado na camada interna da túnica

albugínea. A comunicação entre os dois corpos cavernosos é possível através de orifícios que surgem ao longo do septo. Histologicamente, o tecido cavernoso é constituído por músculo liso trabecular, revestido por endotélio e, por tecido conjuntivo, que contém fibroblastos e troncos nervosos (Anderson & Wagner, 1995; Hsu *et al*, 2004).

As fibras musculares lisas do corpo cavernoso são responsáveis pelo sistema contráctil cavernoso. Este é constituído por dois tipos de miofilamentos, finos e grossos, que se sobrepõem. A extensão desta sobreposição determina o grau de contracção ou relaxamento muscular (Tejada, 2002). Cada um dos filamentos mais finos é composto por vários pares de uma proteína globular, a actina, dispostas em linha. Estes também contêm uma pequena quantidade de outras proteínas reguladoras, como a tropomiosina, a caldesmon e a calponina. Os filamentos finos terminam num corpo denso dentro do citoplasma ou num fragmento no citoplasma, o que resulta num sistema de ancoragem, que quando puxado permite que os filamentos finos deslizem, causando um encurtamento das células musculares lisas durante a contracção. Os filamentos grossos são compostos por várias unidades de miosina, constituída por duas grandes cadeias pesadas e dois pares de cadeias leves. As cadeias pesadas são constituídas por uma “cauda” longa em forma de bastonete, que polimeriza com outras moléculas de miosina, formando o eixo do filamento grosso, e por uma “cabeça” globular protuberante, que forma as “pontes cruzadas”, orientadas para os filamentos finos. Dos dois pares de cadeias leves da molécula de miosina, um par é designado de “essencial” e o outro de “regulador”, tendo este último um importante papel na regulação da contracção das células de músculo liso.

O fenómeno de contracção do músculo liso cavernoso ocorre porque as “cabeças” das moléculas de miosina que se encontram agarradas às moléculas de actina, produzem um forte movimento de serra sucessivamente, gerando uma força actina-miosina (“pontes-cruzadas”), que puxa os filamentos finos de actina ao longo dos filamentos grossos de miosina, encurtando assim a fibra muscular (Watras, 2009; Mas, 2010).

A túnica albugínea é formada por uma camada interna circular e por uma camada externa longitudinal, constituída por fibras de colagénio e fibras de elastina, sendo estas últimas as principais responsáveis pela capacidade elástica do pénis.

O corpo esponjoso e os corpos cavernosos estão revestidos por uma membrana espessa e resistente, denominada de Faixa de Buck. Por sua vez, a Faixa de Buck está

revestida por uma membrana designada de Faixa de Colles, extremamente extensível e sensível, e encontra-se intimamente ligada à parede abdominal.

O corpo do pênis fixa-se no osso púbico por um espessamento do músculo. O músculo recto do abdómen encontra-se no centro da parede abdominal e existe um prolongamento da aponevrose deste músculo que suspende o pênis, designado de ligamento fundiforme (Anderson & Wagner, 1995; Hsu *et al.*, 2004).

3. Cultura de Células

A cultura de células animais e vegetais tem tido um papel cada vez mais importante no progresso da investigação científica na área da Biologia.

A cultura de tecidos envolve um conjunto de técnicas que permite cultivar e/ou manter células isoladas fora do organismo de origem, através de um processo de isolamento de tecidos/órgãos de um animal ou planta colocado num ambiente apropriado de forma a mimetizar as condições *in vivo* com meio de cultura capaz de fornecer nutrientes essenciais para a sobrevivência e crescimento das células, num receptáculo adequado (plástico ou vidro) (Freshney, 2006).

As primeiras células animais foram isoladas em 1907 por Ross Harrison. No entanto, foi apenas a partir das décadas de 40 e 50 do século XX que as culturas de células se começaram a evidenciar na ciência (Ryan, 2008).

A utilização de culturas de células permite: o controlo das condições ambientais, a análise independente de diferentes parâmetros, o elevado número de ensaios num reduzido intervalo de tempo, a redução dos ensaios com animais, e é uma técnica experimental menos dispendiosa do que a experimentação animal. Por outro lado, as principais desvantagens incluem: a perda das características fenotípicas das células originais, a perda de homologia do sistema biológico fora do ambiente natural, e a ausência de sinais nervosos, endócrinos ou outros importantes sobre as células em cultura fora do seu ambiente nativo (Hartung *et al.*, 2002).

i. Tipos de Culturas Celulares

O processo de cultura de células segue uma de duas metodologias distintas e, eventualmente, complementares: culturas primárias e linhas celulares imortalizadas. As culturas celulares estudadas no período após a remoção do tecido são designadas de culturas primárias. E as linhas celulares permanentes são culturas obtidas a partir de células imortalizadas (normalmente linhagens de células tumorais).

As culturas primárias e subculturas iniciais são isoladas de seres vivos, como humanos, animais ou vegetais, apresentando populações celulares heterogêneas, ou seja, diferentes populações celulares em vários estados de diferenciação. Cada amostra removida do tecido de origem é única e impossível de ser reproduzida exactamente igual, uma vez que o processo de diferenciação celular se inicia no momento em que o tecido é removido do dador, sendo por isso estas culturas consideradas dinâmicas e em constante alteração. As culturas primárias de células requerem meios de cultura complexos, muitas vezes difíceis de padronizar. No entanto, neste tipo de cultura há uma menor probabilidade de ocorrerem alterações fenotípicas, bem como alterações devidas ao envelhecimento celular (Freshney, 2006).

As colónias de células formadas *in vitro* apresentam variação de tamanho e de morfologia, reflectindo a origem pluripotencial das mesmas. Estudos demonstram que a proliferação e diferenciação das colónias celulares são influenciadas por hormonas e factores de crescimento (Hartung *et al.*, 2002).

Neste trabalho, as culturas de células de tecido cavernoso a obter são consideradas heterogêneas, uma vez que nestas culturas podem apresentar-se os vários tipos celulares constituintes do tecido peniano. No entanto, as culturas primárias a obter serão as mais representativas do tecido de origem.

Culturas de células permanentes ou contínuas são constituídas por um único tipo de células que se propagam em série durante um número limitado de divisões celulares (aproximadamente trinta) ou, em alguns casos, de forma ilimitada. Estas linhas celulares constituem populações de células homogêneas, fenotipicamente estáveis, mais reprodutíveis e mais fáceis de manter em cultura. No entanto, estas células podem ser transformadas, ou seja, como apresentam uma relação proliferação-diferenciação dissociada, podem não reflectir o fenótipo de uma população celular normal (Freshney, 2006).

As células com número limitado de divisões são, normalmente, células diplóides, que mantêm um certo grau de diferenciação. O facto de estas células apresentarem fenómenos de senescência ao fim de algumas divisões celulares significa que as técnicas de cultura devem ser realizadas da forma mais rigorosa possível para que estas consigam sobreviver por um período de tempo considerável.

As células que se dividem indefinidamente apresentam esta capacidade porque são, normalmente, células que se transformam em células tumorais (imortalizadas). Esta transformação pode ser induzida pela introdução de oncogenes virais ou tratamentos químicos. A grande vantagem destas linhas celulares tumorais/imortais é a sua quase ilimitada disponibilidade, no entanto, têm a desvantagem de irem perdendo as características originais das células (*in vivo*) (Hartung *et al.*, 2002).

ii. Método de obtenção de culturas primárias

A obtenção de culturas primárias de células é essencialmente realizada por duas técnicas distintas: a técnica de explante e a técnica de dissociação enzimática.

As culturas obtidas por estas técnicas são culturas heterogéneas e, ao longo do tempo, tornam-se fibroblásticas se não se introduzirem artefactos técnicos para se limitar a sua (des)diferenciação. O processo de realização destas culturas tem como desvantagem principal o tempo de sobrevida limitado das células, e como grande vantagem a capacidade destas manterem *in vitro* as características observadas *in vivo* (Freshney, 2006).

As culturas primárias realizadas pela técnica de explante são obtidas pela recolha cirúrgica de tecido, posteriormente dissociado em pequenos pedaços e colocado numa caixa de cultura (plástico ou vidro), imerso em meio de cultura adequado. Alguns dias depois, as células começam a migrar dos pedaços de tecido, sendo estes retirados para que as células cresçam e se dividam convenientemente. A grande desvantagem do método de explante advém da fraca aderência de alguns tecidos, nomeadamente (como veremos adiante) do tecido cavernoso, às caixas de cultura (Ryan, 2008).

Outro método para a obtenção de culturas primárias de células é pela técnica de dissociação enzimática. Esta técnica é actualmente muito utilizada, pois o processo de dissociação das células a partir do tecido é acelerado pela adição de enzimas digestivas (proteolíticas), como a tripsina e a collagenase, que clivam as ligações entre as células,

fragmentando o tecido. Assim, obtém-se uma suspensão de células que será colocada em caixas de cultura juntamente com o meio de cultura adequado para o crescimento e divisão celular. O uso das proteases na digestão enzimática é a grande desvantagem desta técnica, pois estas podem apresentar efeitos de toxicidade nas células, removendo proteínas da superfície celular importantes para os estudos a desenvolver. A sua principal vantagem é a grande quantidade de células que se conseguem obter por este método num curto intervalo de tempo (Ryan, 2008).

Quando as culturas primárias de células atingem a confluência, ou seja, as células resultantes destas culturas atingem o seu desenvolvimento máximo, estas devem ser colocadas em subcultura para que possam continuar a crescer e para possibilitar a sua utilização no estudo. O processo para a realização de subculturas passa novamente por uma dissociação enzimática, em que enzimas semelhantes às usadas no método de cultura por dissociação enzimática, separam suavemente as células entre si e da caixa de cultura, obtendo-se de novo uma suspensão de células (Ryan, 2008).

***iii.* Características e Morfologia das Culturas**

As culturas de células podem apresentar-se sob duas formas, em suspensão ou em monocamada aderente. A forma como estas se apresentam é indicativa do tecido no qual tiveram origem. Por exemplo, culturas de células sanguíneas normalmente apresentam-se em suspensão, enquanto culturas de células de tecidos sólidos crescem em monocamada aderente.

Diversos estudos mostram que as características funcionais e morfológicas das culturas celulares podem ser distinguidas em epiteliais, linfoblásticas e fibroblásticas. As características das culturas de células dependem essencialmente da sua origem e da sua forma de adaptação às condições a que a cultura está sujeita. Estas características funcionais e morfológicas podem ser avaliadas com marcadores específicos, nomeadamente, marcadores bioquímicos (e.g. enzimas específicas, proteínas de membrana), úteis em estudos funcionais e, marcadores ultraestruturais (e.g. filamentos, organelos específicos), indispensáveis no estudo morfológico. Muitas vezes estas características perdem-se, podendo as linhas celulares capacidade para se dividirem, demonstrando sinais de envelhecimento contínuos - células de finitas (Freshney, 2006; Ryan, 2008).

iv. Condições de cultura

O meio de cultura é um factor complexo mas importante para se alcançar a cultura pretendida. O meio de cultura é uma solução essencialmente constituída por sais, açúcares e aminoácidos. Os seus requisitos nutricionais dependem muito do tipo de células que se pretendem obter. As condições a que a cultura está sujeita devem ser fisiológica e bioquimicamente semelhantes às que as células ostentam *in vivo*, para que se consiga o maior número de células *in vitro* (Hartung *et al.*, 2002).

O meio de cultura ideal necessita de factores ambientais importantes como a temperatura, a humidade e os gases essenciais (oxigénio e dióxido de carbono), e de factores bioquímicos, como factores de adesão, factores de crescimento, regulação do pH e da osmolalidade.

A cultura é normalmente colocada a uma temperatura semelhante à corporal do dador de onde foi recolhido o tecido. Sendo que os vertebrados de sangue frio apresentam uma temperatura corporal entre 18° e 25°C, enquanto os mamíferos apresentam uma temperatura corporal de cerca de 37°C. A manutenção da temperatura é conseguida em incubadoras colocadas num ambiente estável. O controlo da humidade e dos gases essenciais também é, geralmente, realizado pela incubadora. Sendo que a atmosfera deve apresentar humidade de 90 a 98% e CO₂ de 2 a 10% (Freshney, 2006).

As células necessitam de uma base de suporte, *in vitro* este suporte é dado pelo plástico ou vidro das caixas de cultura. No entanto, muitas vezes este suporte não é suficiente, tendo de ser adicionados factores de adesão, como colagénio, gelatina, fibronectina, laminina e poli-D-lisina, que permitem além de uma melhor adesão do tecido e das células, um melhor crescimento e proliferação das mesmas. Alguns autores sugerem que nas culturas de células de tecido cavernoso se utilize um factor de adesão para revestir as caixas de cultura (Baev *et al.*, 1998). A funcionalidade das células parece melhorar quando a superfície de adesão é porosa, pois assim podem polarizar de forma similar ao que acontece *in vivo* (Freshney, 2006).

Para o crescimento e proliferação das células é necessário que estas produzam proteínas e energia, essenciais para o seu metabolismo, sendo os factores de crescimento e as hormonas, complementos importantes na regulação e no controlo da taxa de crescimento celular. Também o soro animal é muitas vezes adicionado directamente ao meio de cultura para o compensar nutricionalmente.

Nas culturas de células devem evitar-se grandes variações de pH, mantendo-o num intervalo de 7,0 a 7,4. A maioria dos meios de cultura comercialmente disponíveis incluem um indicador de pH, nomeadamente o vermelho de fenol, que monitoriza alterações de pH pela mudança de cor do meio de cultura, sendo que o meio muda para cor amarela se acidificar, ou para cor púrpura se alcalinizar (Freshney, 2006).

A osmolalidade (pressão osmótica) é um aspecto muito importante do meio de cultura, uma vez que é esta que regula o fluxo de substâncias entre o interior e o exterior das células. Sendo assim, deve evitar-se a evaporação do meio de cultura das caixas, pois ocorrerá uma drástica diminuição da osmolalidade danificando as células, causando-lhes stress ou mesmo a morte. Daí que seja indispensável manter o nível de humidade da incubadora elevado (Ryan, 2008).

São constituintes básicos do meio de cultura sais inorgânicos, hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas, ácidos gordos e lípidos, proteínas e péptidos, entre outros. Os sais inorgânicos mantêm o equilíbrio osmótico e regulam o potencial de membrana pelo fornecimento de iões de cálcio, sódio e potássio. Iões estes que juntamente com co-factores enzimáticos são essenciais para a matriz de adesão celular. Os hidratos de carbono, normalmente açúcares como a glicose e a galactose, quando em elevadas concentrações no meio permite manter o crescimento dos vários tipos de células. As vitaminas são precursoras de vários factores, sendo particularmente importantes as do grupo B que são essenciais para o crescimento e proliferação celular, como a vitamina B12 que para uma grande maioria das células é primordial. As vitaminas A e E também podem aparecer nos meios de cultura, mas as mais comuns são a riboflavina, tiamina e biotina. Também o zinco, cobre, selénio e ácido tricarboxílico podem ser encontrados em concentrações vestigiais no meio de cultura, mas são de grande importância para a funcionalidade normal das células. O selénio, por exemplo, é desintoxicante porque ajuda na remoção de radicais livres de oxigénio.

Todos estes elementos podem ser comumente encontrados no soro animal. O soro é uma solução complexa, que inclui a albumina, potenciadores e/ou inibidores de crescimento, sendo um importante suplemento dos meios de cultura. O soro de bovino fetal é o mais utilizado. As suas principais funções estão relacionadas com protecção mecânica, capacidade de tamponar culturas com proliferação reduzida, ligação e neutralização de toxinas (Freshney, 2006).

v. Avaliação das culturas

A avaliação das culturas de células baseia-se essencialmente na morfologia das células, crescimento celular, eficácia da cultura e expressão de funções específicas.

A morfologia ou forma das células é o mais fácil de determinar, porém é difícil de relacionar essas observações com a verdadeira identidade celular. Muitas vezes são observadas alterações morfológicas difíceis de avaliar, principalmente em relação à sua causa. O primeiro sinal indicativo de uma cultura comprometida acontece quando se verifica, por visualização ao microscópio óptico, alterações na morfologia das células, no padrão de adesão e, uma reduzida taxa de crescimento (Ryan, 2008).

A contagem de células é importante para estimar a taxa de crescimento celular, e assim avaliar se as condições da cultura são as adequadas. Esta técnica também permite medir a sobrevivência e morte celular. A execução desta técnica é normalmente realizada com uma câmara de *Neubauer* ou com um contador de partículas electrónico. Para a contagem na câmara de *Neubauer* as células são diluídas com azul tripano, permitindo uma avaliação quantitativa de viabilidade celular, uma vez que as células que incorporam o corante são células mortas, e as que não permitem a entrada do corante são células vivas. Esta técnica, apesar de exaustiva, é pouco dispendiosa e fiável.

A eficácia da cultura é medida pelo número de colónias de células presentes nas caixas de cultura. A percentagem de colónias indica a sobrevivência celular, enquanto o tamanho das colónias indica a taxa de crescimento. Esta medição também é muito útil na avaliação dos requisitos nutricionais das células, permitindo comparar tipos de meio de cultura e componente tóxicos (Freshney, 2006; Ryan, 2008).

A expressão funcional das células é geralmente difícil de medir e observar, pelo que se recorre a testes bioquímicos e imunológicos para a sua determinação.

vi. Contaminações nas culturas celulares

A contaminação de culturas de células pode acontecer por factores químicos e/ou biológicos. Os contaminantes químicos são os mais difíceis de detectar, como por exemplo, toxinas, iões metálicos e vestígios de detergentes/desinfectantes. Por outro lado, os contaminantes biológicos, como bactérias e fungos, causam danos irreversíveis nas células sendo por isso mais fáceis de detectar, principalmente quando os antibióticos são

excluídos das culturas. Contudo, a contaminação biológica por *Mycoplasma* ou vírus não é visualmente detectável e requer métodos de detecção específicos.

Para se evitarem contaminações nas culturas de células devem seguir-se algumas normas, tais como, o investigador deve possuir prática em cultura de células, todo o equipamento, material e reagentes devem estar em condições assépticas e devidamente monitorizados. A utilização prolongada de antibióticos e antimicóticos pode mascarar a presença de microorganismos, levando ao desenvolvimento de estirpes multiresistentes. Por isso, a avaliação da contaminação biológica nas culturas deve ser feita diariamente por observação das mesmas ao microscópio óptico.

Uma vez detectada uma contaminação bacteriana ou fúngica, todos os reagentes utilizados na cultura bem como a própria cultura devem ser descontaminados com hipoclorito de sódio e posteriormente descartados para o contentor dos resíduos biológicos (Freshney, 2006; Ryan, 2008).

4. Transmissão Purinérgica

As primeiras publicações que avaliaram as acções fisiológicas dos nucleótidos e nucleósidos da adenina, ATP e adenosina, surgiram em 1929 por Drury and Szent-Györgi, em estudos dos efeitos da adenosina como um importante regulador fisiológico no coração e vasos sanguíneos de mamíferos.

Vários estudos foram entretanto surgindo e várias são as actividades fisiológicas atribuídas hoje em dia à adenosina. Apenas em 1970-1972, Burnstock e colaboradores determinaram o efeito do ATP como neurotransmissor, em nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos do intestino, e propuseram os termos ‘purinérgico’ e ‘neurotransmissão purinérgica’. Esta hipótese foi posta em causa durante anos, uma vez que o ATP era considerado apenas uma importante fonte de energia intracelular. Sabemos hoje que os efeitos bioquímicos do ATP não são apenas estes, mas este composto também se encontra envolvido na sinalização extracelular selectiva (Figura III) (Burnstock, 2006b).

A sinalização purinérgica está actualmente envolvida em actividades do sistema nervoso, como a neuroprotecção, o controlo das funções autonómicas, a interacção com a neuroglia, o controlo do tónus vascular e a angiogénese, a dor e a transdução mecanossensorial, e a fisiologia dos sentidos especiais (Burnstock, 2006a).

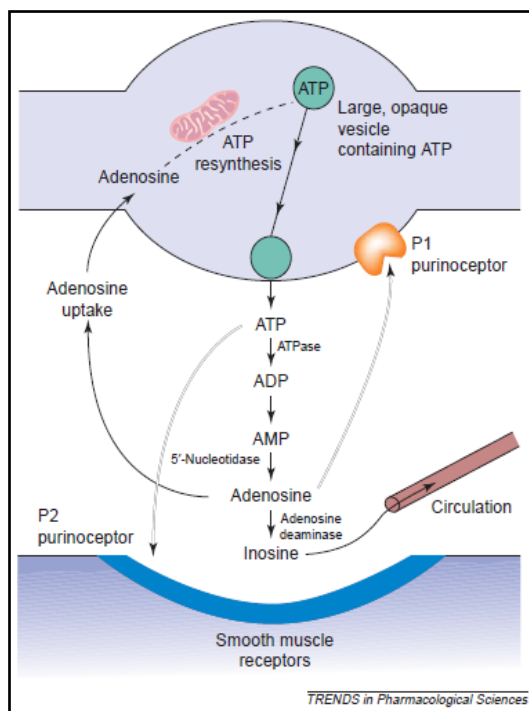


Figura III: Efeito purinérgico na junção moneural, exibindo a síntese, armazenamento, libertação e inactivação do ATP (Imagem retirada de Burnstock, 2006a).

i. Adenosina

A adenosina (Figura IV) é um nucleosídeo natural que é constituinte de todas as células. Está envolvido em vias purinérgicas, como a síntese dos ácidos nucleicos, ARN e ADN, metabolismo dos aminoácidos e modulação do metabolismo celular, pelo desempenho de funções reguladoras e energéticas em nucleotídeos como AMPc e ATP (Fox & Kelley, 1978; Stone, 1985; Cunha, 2001).

A adenosina forma-se intra e extracelularmente pela metabolização da adenina. Intracelularmente a adenosina forma-se pela desfosforilação do monofosfato de adenosina (AMP) catalisada pela 5'-nucleotidase ou, pela degradação da s-adenosil-homocisteína catabolizada pela s-adenosil-homocisteína-hidrolase (Kredich & Hershfield, 1980). No

interior das células, a adenosina é catabolizada por duas enzimas, a adenosina cinase (ADK) e adenosina desaminase (ADA). A ADK fosforila a adenosina em AMP e, é importante para a regulação dos níveis intracelulares de adenosina e para a manutenção dos nucleotídeos intracelulares. A ADA por sua vez catalisa irreversivelmente a adenosina em inosina (Fredholm *et al.*, 2001; Fredholm, 2007). A adenosina extracelular também é gerada pela degradação dos nucleotídeos da adenina. Os nucleotídeos de adenosina extracelular são desfosforilados por ectonucleotidases, como a NTPDase1 ou CD39, que catalisa a hidrólise de ATP e ADP em AMP. A ecto-5'-nucleotidase (CD37) catalisa a desfosforilação da AMP a adenosina. A adenosina extracelular é transportada para o interior das células através de transportadores de nucleosídeos (ENT) (Fredholm *et al.*, 2001; Colgan *et al.*, 2006).

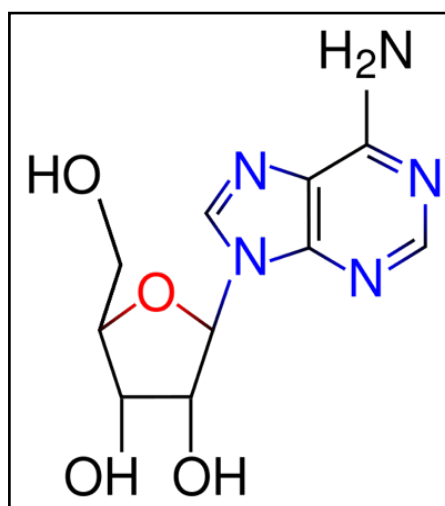


Figura IV: Estrutura química da Adenosina (Imagem retirada de <http://eltamiz.com/>)

ii. Receptores Purinérgicos

Os nucleótidos de adenina regulam a comunicação intercelular através de receptores presentes na membrana celular. A presença de receptores purinérgicos está implícita na hipótese da transmissão purinérgica. Existem dois tipos de receptores purinérgicos: P1, activados principalmente pela adenosina (ADO), e P2, activados por nucleótidos da adenina (ATP, ADP e polifosfatos de adenosina) e da uridina (UTP e UDP) (Burnstock, 1978). Estas moléculas estão envolvidas em inúmeros processos fisiológicos e

patológicos, como por exemplo a transmissão sináptica, o controlo do tónus da musculatura lisa vascular e a inflamação (e.g. Villa *et al.*, 2010). Mais tarde, foram descritos dois subtipos de receptores P2: P2X (canal iónico) e P2Y (receptor acoplado à proteína G) (Figura V) (Burnstock & Kennedy, 1985; Erlinge & Burnstock, 2008).

Receptor	Main distribution	Agonists ^c	Antagonists ^c	Transduction mechanisms
P1 (adenosine)				
A ₁	Brain, spinal cord, testis, heart, autonomic nerve terminals	CCPA, CPA	DPCPX, N0840, MRS1754	G _{i1} , G _{i2} and G _o , ↓cAMP
A _{2A}	Brain, heart, lungs, spleen	CGS21680	KF17837, SCH58261	G _s , ↑cAMP
A _{2B}	Large intestine, bladder	NECA (nonselective)	Enprofylline, MRE2029F20	G _s , ↑cAMP
A ₃	Lung, liver, brain, testis, heart	IB-MECA, Cl-B-MECA, DBXRM, VT160	MRS1220, L268605, MRS1191	G _{i2} , G _{i3} and G _{q11} , ↓cAMP, ↑Ins(1,4,5)P ₃
P2X				
P2X ₁	Smooth muscle, platelets, cerebellum, dorsal horn spinal neurons	α,β-meATP = ATP = 2-meSATP (rapid desensitization)	TNP-ATP, IP ₆ , NF023, NF449	Intrinsic cation channel (Ca ²⁺ and Na ⁺)
P2X ₂	Smooth muscle, CNS, retina, chromaffin cells, autonomic and sensory ganglia	ATP ≥ ATPγS ≥ 2-meSATP >> α,β-meATP (pH and zinc sensitive)	Suramin, iso-PPADS, RB2, NF770	Intrinsic ion channel (particularly Ca ²⁺)
P2X ₃	Sensory neurons, NTS, some sympathetic neurons	2-MeSATP ≥ ATP ≥ α,β-meATP ≥ Ap ₄ A (rapid desensitization)	TNP-ATP, PPADS	Intrinsic cation channel
P2X ₄	CNS, testis, colon	ATP >> α,β-meATP, CTP, ivermectin	A317491, NF110	Intrinsic ion channel (particularly Ca ²⁺)
P2X ₅	Proliferating cells in skin, gut, bladder, thymus, spinal cord	ATP >> α,β-meATP, ATPγS	TNP-ATP (weak), BBG (weak)	Intrinsic ion channel
P2X ₆	CNS, motor neurons in spinal cord	– (does not function as homomultimer)	Suramin, PPADS, BBG	Intrinsic ion channel
P2X ₇	Apoptotic cells in, for example, immune cells, pancreas, skin	BzATP > ATP ≥ 2-meSATP >> α,β-meATP	–	Intrinsic cation channel and a large pore with prolonged activation
P2Y				
P2Y ₁	Epithelial and endothelial cells, platelets, immune cells, osteoclasts	2-MeSADP > 2-meSATP = ADP > ATP, MRS2365	MRS2179, MRS2500	G _q /G ₁₁ ; PLC-β activation
P2Y ₂	Immune cells, epithelial and endothelial cells, kidney tubules, osteoblasts	UTP = ATP, UTPγS, INS37217	Suramin > RB2, ARC126313	G _q /G ₁₁ and possibly G _i ; PLC-β activation
P2Y ₄	Endothelial cells	UTP ≥ ATP, UTPγS	RB2 > suramin	G _q /G ₁₁ and possibly G _i ; PLC-β activation
P2Y ₆	Some epithelial cells, placenta, T cells, thymus	UDP > UTP >> ATP, UDPβS	MRS2578	G _q /G ₁₁ ; PLC-β activation
P2Y ₁₁	Spleen, intestine, granulocytes	ARC67085 > BzATP ≥ ATPγS > ATP	Suramin > RB2, NF157	G _q /G ₁₁ and G _s ; PLC-β activation
P2Y ₁₂	Platelets, glial cells	2-MeSADP ≥ ADP >> ATP	CT50547, ARC69831MX, INS49266, AZD6140, PSB0413	G _i (G _o); inhibition of adenylyl cyclase
P2Y ₁₃	Spleen, brain, lymph nodes, bone marrow	ADP = 2-meSADP >> ATP and 2-meSATP	MRS2211	G _i /G _o
P2Y ₁₄	Placenta, adipose tissue, stomach, intestine, discrete brain regions	UDP glucose = UDP-galactose	–	G _q /G ₁₁

Figura V: Tabela com as características dos receptores de purinas e pirimidinas (Imagem retirada de de Burnstock, 2006a).

Foram identificados quatro subtipos de receptores metabotrópicos para adenosina (P1): A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Figura V). Os receptores A₁ e A₃ promovem a inibição da adenilciclase através de proteínas Gi/o, e os receptores A_{2A} e A_{2B}, pelo contrário, estimulam a adenilciclase através das proteínas Gs (Ralevic & Burnstock, 1998; Fredholm *et al.*, 2001). Os receptores A₁ apresentam elevada afinidade para a adenosina (Castillo *et al.*, 2007). Estes são receptores pleiotrópicos, capazes de influenciar correntes de cálcio e potássio e de alterar a actividade das fosfolipases A₂ e C e da guanilciclase (Collis & Hourani, 1993). Os receptores A_{2A} e A_{2B} activam a adenilciclase e podem ser distinguidos

pela sua afinidade para a adenosina: os de maior afinidade (A_{2A}) e os de menor afinidade (A_{2B}).

Os receptores A_3 , por sua vez, apresentam baixa afinidade para a adenosina nos roedores, comportando-se como receptores de elevada afinidade no Homem (Castillo *et al.*, 2007). Estes receptores activam a cascata da fosfolipase C/IP3/diacilglicerol através da proteína Gq/11 (Fredholm *et al.*, 2001; Yaar *et al.*, 2005).

iii. Papel da Adenosina na (Dis)função erétil

A adenosina está directamente envolvida nos mecanismos responsáveis pelo controlo do tónus vascular local, para além de regular fenómenos de migração, proliferação e morte celular associados à angiogénese, aterosclerose e re-estenose (Burnstock, 2006a). Os efeitos biológicos da adenosina dependem da sua concentração junto dos locais activos (formação/inactivação), da distribuição regional dos vários subtipos de receptores específicos (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3), e dos segundos mensageiros envolvidos na resposta (e.g. AMP cíclico, GMP cíclico, IP_3 , Ca^{2+} , K^+). Através da activação de receptores A_2 , a adenosina causa vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, reduz a adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular, atenua a lesão endotelial induzida pela marginação dos neutrófilos, e estimula a libertação endotelial de NO favorecendo o relaxamento do músculo liso vascular.

Num trabalho pioneiro realizado no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP, foi possível demonstrar que a adenosina regula o tónus muscular dos corpos cavernosos humanos (CCH) através da activação de receptores A_{2A} e A_{2B} localizados no músculo liso e no endotélio vascular, respectivamente (Faria *et al.*, 2006). Comparando a magnitude das respostas relaxantes causadas pela adenosina no tecido cavernoso isolado de indivíduos controlo e de homens portadores de disfunção erétil (DE) com factores de risco endotelial (e.g. *Diabetes mellitus* do tipo 2, hipercolesterolemia, hipertensão arterial, fumadores), foi possível concluir que a disfunção endotelial apresentada pelos doentes se correlacionava com a perda de actividade dos receptores A_{2B} , mantendo inalterado o efeito relaxante mediado pelos receptores A_{2A} localizados no músculo liso vascular. Apesar de haver necessidade de mais estudos para investigar a distribuição regional dos receptores da adenosina nos vasos penianos humanos e os segundos mensageiros envolvidos, a manutenção da actividade relaxante dos receptores

A_{2A} nos doentes portadores de DE vasculogénica resistente aos fármacos vasodilatadores habituais (e.g. sildenafil, alprostadil e similares) abre novas perspectivas para o tratamento médico das formas mais graves desta patologia.

Conforme referido anteriormente, a adenosina é um regulador potente da remodelação vascular, através da sua acção inibitória sobre o crescimento das fibras musculares lisas (Dubey *et al.*, 2000) e do seu papel promotor da proliferação endotelial (Sexl *et al.*, 1995). O efeito anti-mitogénico da adenosina é mediado pela activação de receptores A_{2B} e foi demonstrado em culturas de músculo liso da aorta, de fibroblastos cardíacos e de células mesangiais glomerulares de rato. Contrariamente, a adenosina possui uma acção mitogénica nas células endoteliais da veia umbilical humana (Sexl *et al.*, 1995), da retina humana (Grant *et al.*, 1999) e da artéria coronária de porco (Dubey *et al.*, 2000), através da activação de receptores A₂. O subtipo de receptor da adenosina, A_{2A} ou A_{2B}, e os mecanismos intracelulares envolvidos na acção da adenosina na proliferação/remodelação das células do tecido cavernoso humano permanecem desconhecidos.

Para que a adenosina exerça actividade sobre a proliferação celular, nomeadamente através de receptores com baixa afinidade para o nucleósido (A_{2B}), é necessário que os seus níveis extracelulares sejam significativos e consideravelmente estáveis. Estudos recentes demonstraram que a adenosina possui uma cinética de inactivação lenta no tecido cavernoso humano, facto que justifica o seu papel no controlo da erecção no homem (Faria *et al.*, 2006) e a possibilidade desta molécula exercer um efeito trófico nos vasos penianos humanos, cuja insuficiência pode estar na base da etiopatogenia da disfunção erétil vasculogénica.

Capítulo II – Material e Métodos

1. Amostras de Tecido Cavernoso e Considerações Éticas

i. Isolamento do Tecido Cavernoso

O tecido cavernoso humano foi isolado a partir de indivíduos controlo (dadores de órgãos) e de doentes com disfunção erétil vasculogénica grave seguidos na consulta de Andrologia do Centro Hospitalar do Porto (CHP) por ocasião da implantação de próteses penianas. Os dois grupos estudados (controlos e doentes) foram constituídos por indivíduos do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 45 e os 65 anos, integrados no estudo consecutivamente. Todos os doentes foram informados dos procedimentos e assinaram a declaração de consentimento informado, a fim de acautelar a privacidade e confidencialidade dos dados fornecidos, garantindo sempre que estes não serão utilizados para outros fins que não a investigação e, que a investigação não seja mais intrusiva do que o necessário na vida dos pacientes.

Os protocolos para colheita de tecidos e realização das experiências foram aprovados pelas Comissões de Ética das instituições envolvidas no projecto (C.H.P. – Hospital Geral de Santo António e Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto) e devidamente autorizados pela Comissão Nacional de Ética para as Ciências da Vida. A investigação respeita os princípios consignados na Declaração de Helsínquia. Após a sua colheita, o tecido cavernoso humano foi conservado a 4-6°C em solução de transplantação M-400 não suplementada com ATP ou adenosina (composição em g por 100 ml: manitol 4,190; KH_2PO_4 0,205; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,970; KCl 0,112; NaHCO_3 0,084; pH 7,4) até à sua utilização, que foi efectuada 2 a 16 horas após a colheita (Simonsen *et al.*, 1997).

O tecido cavernoso de rato foi colhido a partir de *Ratus norvegicus* machos da estirpe *Wistar* (Charles River – CRIFFA, Barcelona, Espanha; Biotério do ICBAS, Porto, Portugal) com um peso entre os 250 g e os 350 g. Os animais foram sacrificados por decapitação e manipulados de acordo com as orientações definidas pela Comunidade Europeia do Concelho (86/609/CEE), relativamente ao bem-estar animal e tendo em atenção a política dos 3R's (Redução, Reutilização e Reciclagem). Os animais foram sacrificados por decapitação por guilhotina e, os órgãos isolados foram colocados numa caixa de Petri contendo uma solução de Tyrode (composição (mM): NaCl 137; KCl 2,7;

CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 1; NaH₂PO₄ 0,4; NaHCO₃ 11,9; glucose 11,2), oxigenada com uma mistura de O₂ (95 %) e CO₂ (5 %), à temperatura ambiente.

ii. Processamento das Amostras de Tecido

O tecido cavernoso após ter sido cuidadosamente separado das estruturas que o envolviam, como a túnica albugínea, foi submetido a um processo de descontaminação. Os fragmentos de tecido cavernoso, humano e/ou de rato, foram transferidos para um meio de cultura apropriado (AB10x), contendo uma elevada concentração de substâncias antimicrobianas, nomeadamente 25 µg/mL de anfotericina B (250 µg/mL, Sigma), 1000 IU/mL de penicilina, 1000 µg/mL de estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000 µg/mL, Sigma) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma). Procedeu-se a três ciclos de descontaminação, de cerca de 30 minutos, com o AB10x.

2. Cultura de Células de Músculo Liso

i. Cultura pela Técnica de Explante

O tecido cavernoso foi cortado em pequenos fragmentos que, de seguida, foram distribuídos uniformemente em caixas de cultura de 35 mm (Costar) previamente revestidas com um factor de adesão, nomeadamente a gelatina a 2 % em PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma). O revestimento das caixas de cultura teve como objectivo melhorar a aderência do tecido às caixas de cultura e melhorar as condições de crescimento das células.

Com os fragmentos de tecido já aderentes à caixa de cultura, adicionou-se um volume adequado de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) contendo soro bovino fetal 20 % (SBF, Sigma), 2,5 µg/mL de anfotericina B (250 µg/mL, Sigma), 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000 µg/mL, Sigma). As culturas foram incubadas a 37 °C em atmosfera húmida contendo 5 % de CO₂.

A migração celular a partir dos pequenos fragmentos foi observada 10 a 12 dias após o início das culturas primárias, sendo estas mantidas até próximo da confluência (cerca de 15 dias depois); nesta fase, os fragmentos de tecido foram removidos.

ii. Cultura pela Técnica de Dissociação Enzimática

O tecido cavernoso foi cortado em pequenos fragmentos, sendo de seguida transferidos para uma solução de digestão estéril, meio de cultura contendo Colagenase Tipo I(A) (0,25 %, Sigma), e mantidos durante uma hora a 37 °C em banho-maria com agitação.

A suspensão obtida foi centrifugada a 200 g durante 10 minutos a 4 °C. Para parar a digestão enzimática o sobrenadante foi eliminado e adicionado meio de cultura fresco ao *pellet*.

A suspensão celular foi distribuída por caixas de cultura de 35 mm (Costar), previamente revestidas com gelatina a 2 % em PBS (Sigma). As culturas foram realizadas em meio de cultura M199 (Sigma), contendo SBF 20 % (Sigma), 3,75 µg/mL de anfotericina B (250 µg/mL, Sigma), 150 IU/mL de penicilina, 150 µg/mL de estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000 µg/mL, Sigma) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma). As culturas foram incubadas a 37 °C em atmosfera húmida contendo 5 % de CO₂, até que estas atingissem a confluência pretendida.

iii. Manutenção das Culturas

Em ambos os sistemas de cultura, a primeira mudança de meio foi efectuada ao fim de sete dias de cultura, usando os respectivos meios acima referidos, no entanto, o SBF foi reduzido para 10 %. Na(s) semana(s) seguinte(s), a mudança do meio foi realizada duas vezes/semana, com 3 a 4 dias de intervalo.

As culturas foram examinadas periodicamente com um microscópio invertido de contraste de fase (Olympus, modelo CK 2).

3. Cultura de Células Endoteliais pela Técnica de Dissociação Enzimática

O tecido cavernoso foi cortado em pequenos fragmentos, colocados numa solução estéril de meio de cultura contendo Colagenase Tipo I(A) 0,25 % (Sigma) e submetidos a um processo de digestão enzimático a 37 °C, num banho-maria com agitação, cerca de uma hora. A suspensão obtida foi centrifugada a 200 g durante 10 minutos numa centrífuga refrigerada a 4 °C, o sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* recuperado com meio de cultura ECGM (Endothelial Cell Growth Medium, PromoCell) ao qual foi adicionado suplemento de crescimento de células endoteliais/heparina a 0,4 %, factor de crescimento epitelial a 0,1 ng/ml, factor fibroblástico básico a 1 ng/ml, hidrocortisona a 1 mg/ml e, ainda, SBF a 5 %, 2,5 µg/mL de anfotericina B (250 µg/mL, Sigma), 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000 µg/mL, Sigma). A suspensão de células obtida foi distribuída por caixas de cultura de 35 mm (Costar) previamente revestidas com gelatina a 2 % em PBS (Sigma).

A cultura foi incubada a 37 °C durante 7 dias, numa atmosfera saturada de humidade contendo 5 % de CO₂. Após este período o meio de cultura foi mudado a cada 4 dias até que a cultura atingisse o estado de confluência adequado.

4. Identificação Fenotípica das Células de Tecido Cavernoso e da Expressão dos Receptores Purinérgicos

***i.* Tripsinização das Células**

Após a confluência, procedeu-se à tripsinização das células. Para tal, o meio de cultura foi retirado das caixas e as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril, previamente aquecido a 37 °C, para remover os restos de meio de cultura, nomeadamente o cálcio (inibidor da tripsina). As células aderentes foram então isoladas enzimaticamente [solução de tripsina a 0,04 % (Sigma), pH 7,4, e colagenase a 0,025 % (Sigma) em PBS], durante 10 a 15 minutos; a reacção foi interrompida pela adição de meio fresco e as células

em suspensão foram contadas num hemocítmetro [*Improved Neubauer* (Figura VI)], recorrendo a um corante vital – o azul de tripano (Sigma). A coloração pelo azul de tripano é um método de coloração por exclusão, uma vez que este permite distinguir as células mortas (incorporam o corante) das células vivas (não permitem que o corante passe pela sua membrana), conseguindo-se através da observação ao microscópio óptico avaliar a viabilidade celular e fazer a contagem das células viáveis.

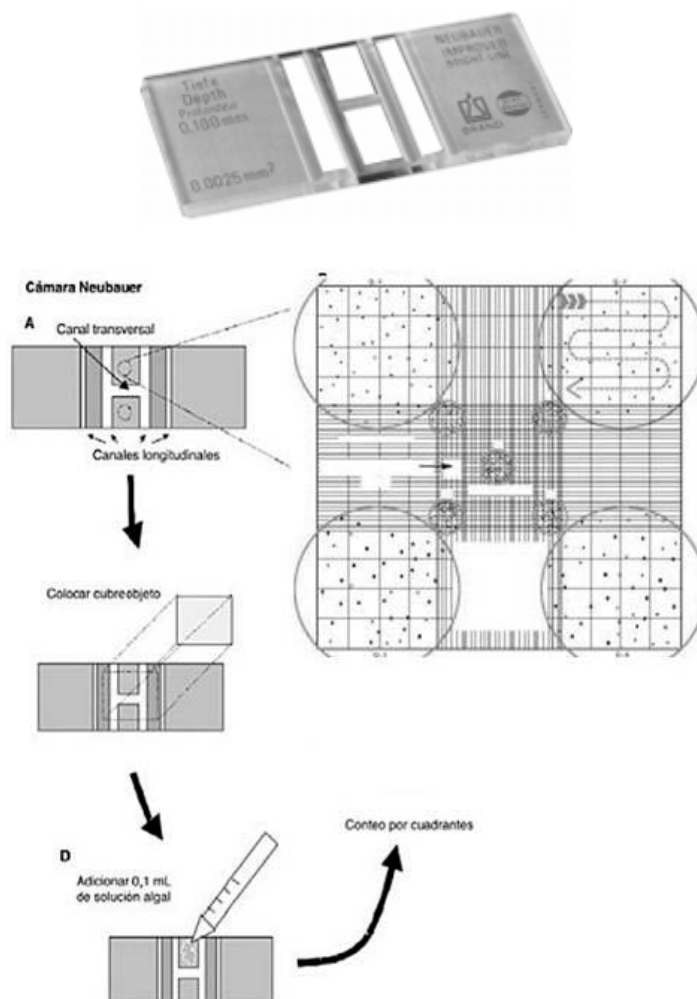


Figura VI: Câmara de *Neubauer* e esquema de contagem de células
(Imagem adaptada de <http://producaobiocombustivel.blogspot.com/> e <http://bmdhelp.blogspot.com/>)

Cálculos efectuados para determinação da concentração de células necessária:

Nº de Células contadas $\times 10^4 \text{mL}$	x	2	= Nº de Células/mL
8		(Factor de Diluição)	
(Nº de Quadrantes de Contagem)			

Nº de Células/mL	x	Vol. a usar	=	2,5x10⁴mL	x	Vol. pretendido
(Concentração Inicial de Suspensão)		(Volume Inicial de Suspensão)		(Concentração Final pretendida)		(Volume Final pretendido)

Após contagem, as células foram diluídas nos respectivos meios de cultura e subcultivadas com uma densidade de 10^4 células/cm², em diferentes placas de cultura de acordo com o fim a que se destinavam.

ii. Imunohistoquímica

As células da primeira subcultura foram cultivadas com uma densidade de $2,5 \times 10^4$ cells/mL em placas *ChamberSlide* (Nunc) (Figura VII), previamente revestidas com gelatina a 2% em PBS (Sigma), até atingirem a confluência. Após este período deu-se início ao procedimento de imunofluorescência indirecta, para identificação das células e localização dos receptores purinérgicos nelas presentes.



Figura VII: Placa ChamberSlide para realização de imunofluorescência indirecta de células. (Imagem retirada de <http://vwrlabshop.com/>)

No final do período de cultura, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4 % em PBS durante 10 minutos com agitação. O PFA é um fixador muito utilizado em imunohistoquímica de células, porque permite uma melhor preservação de todos os constituintes celulares, nomeadamente de antígenos e de enzimas importantes na marcação por imunofluorescência.

A preparação foi posteriormente lavada três vezes com PBS (ciclos de 10 minutos com agitação) e incubada, à temperatura ambiente, com uma solução tampão de bloqueio I (SBF 10 %, BSA 1 % (Albumina Sérica Bovina), e NaN_3 0,05 %, em PBS) durante 1 hora, com agitação. Esta solução de bloqueio permite bloquear ligações não-específicas das células, minimizando a sua interacção com anticorpos ou outras proteínas específicas.

Procedeu-se, então, à marcação indirecta por imunofluorescência utilizando-se um anticorpo (Ab) primário específico contra um antígeno (Ag) alvo e um anticorpo secundário, que reconhece o anticorpo primário, o qual está acoplado a um fluoróforo (Figura VIII).

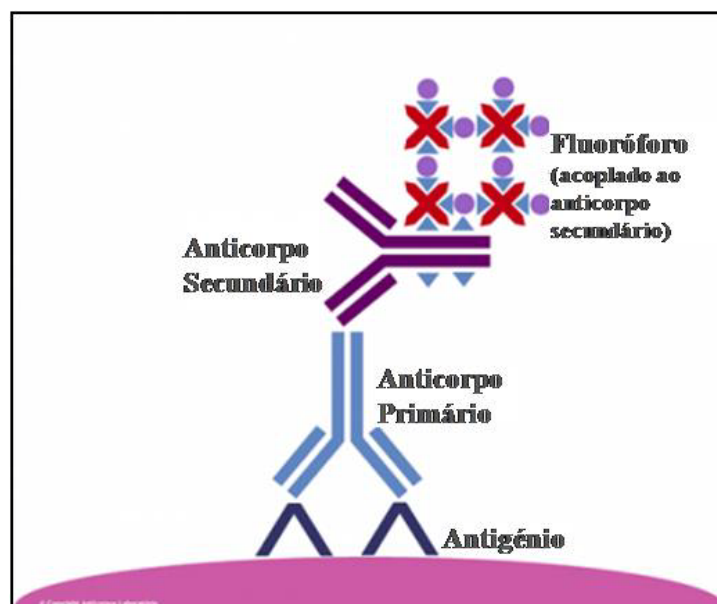


Figura VIII: Representação esquemática do processo de imunofluorescência indirecta (Imagem adaptada de <http://www.sbpc.org.br/>).

De seguida, iniciou-se a marcação das células com anticorpos primários específicos (Tabela I) que foram diluídos numa solução tampão de bloqueio II (SBF 5 %, BSA 1 %, e NaN_3 0,05 %, em PBS) e a *ChamberSlide* foi a incubar a 4°C, no escuro, cerca de 20 horas.

Tabela I: Anticorpos primários utilizados na marcação por imunofluorescência indirecta.			
Anticorpo Primário	Hospedeiro	Diluição	Fonte
Actina de Músculo Liso (SMA-FITC*)	Ratinho (ms)	1:300	Santa Cruz
Factor de vonWillebrand (FVIII)	Ratinho (ms)	1:30	Chemicon
Receptores A_{2A}	Coelho (rb)	1:150	Chemicon
Receptores A_{2B}	Coelho (rb)	1:75	Chemicon
Receptores $P2Y_1$	Coelho (rb)	1:50	Chemicon

*O anticorpo SMA já tem o anticorpo secundário fluorescente adicionado.

Após incubação com os anticorpos primários, as células foram novamente lavadas com PBS (3 ciclos de 10 minutos); foram adicionados os anticorpos secundários fluorescentes, previamente diluídos em tampão de bloqueio II (Tabela II) e as células foram novamente incubadas durante 3 horas, com agitação à temperatura ambiente. A partir deste momento, as células foram mantidas no escuro para que os fluoróforos não sofressem excitação quando atingidos pela luz.

Tabela II: Anticorpos secundários utilizados na marcação por imunofluorescência indirecta.				
Anticorpo Secundário	Hospedeiro	IgG anti-x	Diluição	Fonte
Alexa Fluor 488 anti-rb	Burro	Coelho (anti-rb)	1:1500	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 anti-ms	Burro	Ratinho (anti-ms)	1:1500	Molecular Probes
Alexa Fluor 568 anti-ms	Burro	Ratinho (anti-ms)	1:1500	Molecular Probes
Alexa Fluor 680 anti-rb	Burro	Coelho (anti-rb)	1:1500	Molecular Probes

Depois da incubação com os anticorpos secundários, as células sofreram uma lavagem final com PBS (3 ciclos de 10 minutos). A marcação dupla foi realizada depois deste passo, sendo realizada do mesmo modo que a descrição feita anteriormente.

As células revestidas com meio de montagem VectaShield foram cuidadosamente montadas com uma lamela de vidro e armazenadas a 4 °C. Finalmente, a preparação foi visualizada por microscopia confocal [Olympus FluoView FV1000, Japan (Figura IX)], utilizando os lasers que irradiam num comprimento de onda de gama adequada ao fluoróforo utilizado (Tabela III). Após a visualização das células e recolha das imagens necessárias, estas foram processadas informaticamente com o software do microscópio confocal (FluoViewer FV10-ASW2.0).

Tabela III: Lasers utilizados na observação por imunofluorescência indirecta.		
Laser	Comprimento de Onda	Fluoróforo Excitado
Argon	Gama dos 488nm	Alexa Fluor 488
HeNe1	Gama dos 543nm	Alexa Fluor 568
HeNe2	Gama invisível dos 633nm	Alexa Fluor 680



Figura IX: Microscópio Confocal Olympus FuoView FV1000. (Imagem a retirada de <http://www.olympuslatinoamerica.com/spanish/>)

Capítulo III – Resultados

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos nos ensaios de optimização da técnica de cultura de células de tecido cavernoso humano e de rato (controles). Este foi cultivado *in vitro* sob diferentes condições de cultura, para o estudo do crescimento e proliferação de células de músculo liso e de células endoteliais. As células foram identificadas pela técnica de imunofluorescência indirecta, relativamente à sua morfologia e à presença ou ausência de receptores purinérgicos, nomeadamente P1 e P2, recorrendo a diferentes anticorpos específicos.

A proposta deste trabalho surge da necessidade de obter células de tecido cavernoso humano e de rato, de forma a permitir dar continuidade aos trabalhos experimentais funcionais que têm vindo a ser realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS.

Foram testados dois métodos de cultura de células, nomeadamente por explante e por dissociação enzimática. Alguns factores ambientais e fisiológicos foram testados, como por exemplo, o tipo de meio, a concentração dos suplementos, a temperatura, entre outros. O procedimento testado foi o mesmo independentemente da origem animal do tecido cavernoso. Ambas as culturas celulares obtidas foram submetidas a imunofluorescência indirecta.

1. Otimização da técnica de cultura de células de tecido cavernoso humano e de rato *in vitro*

***i.* Cultura de células de músculo liso de tecido cavernoso**

Para estabelecer os procedimentos específicos de isolamento e diferenciação morfológica de células de tecido cavernoso, foi feita uma pesquisa da literatura sobre o isolamento de células de músculo liso a partir de cultura de células de tecido cavernoso.

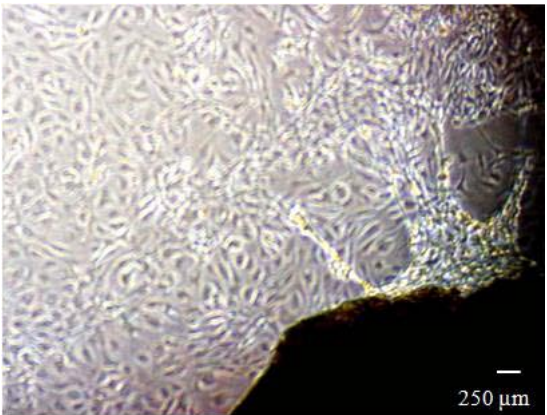
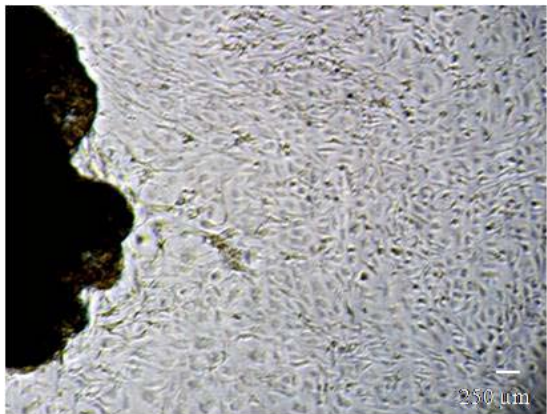
Vários autores referem que o isolamento de células de músculo liso de tecido cavernoso pode ser conseguido pela técnica de explante (Pilatz *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2009). Para isso, o tecido tem de ser cortado em pequenos pedaços e colocados em caixas de cultura com meio de cultura DMEM, suplementado com SBF 10 %, 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, incubadas a 37 °C em atmosfera húmida contendo 5 % de CO₂, até que os fragmentos de tecidos adiram à placa de cultura e as células comecem a migrar a partir dos explantes (cerca de 4 a 10 dias).

Este protocolo serviu de referência aos estudos experimentais iniciais, no entanto, observamos algumas limitações durante a sua execução: verificou-se que as células demoravam cerca de 12 a 15 dias a migrarem dos fragmentos de tecido inicial e a cultura demorava cerca de 30 dias a atingir confluência. Consequentemente, verificou-se que ao fim deste tempo, muitas células apresentavam sinais claros de envelhecimento, afectando o estado/viabilidade da cultura em geral.

Os resultados obtidos, na cultura de células de músculo liso de tecido cavernoso de rato pelo método clássico, encontram-se na tabela IV, onde é feita a descrição das características observadas na cultura, juntamente com as imagens que evidenciam essas mesmas características.

Isolamento e Cultura de Células do Tecido Cavernoso Humano:
Caracterização Fenotípica e Identificação de Purinoceptores por Imunofluorescência

Tabela IV: Morfologia das células de tecido cavernoso de rato cultivadas *in vitro*, em meio de cultura DMEM e, descrição das características adquiridas pela cultura realizada pela técnica de explante, observada por microscopia óptica (escala 250 µm).

Tipo de Cultura	Imagem	Descrição dos Resultados
Cultura de células obtida pela <u>técnica de explante</u> , a partir de tecido cavernoso de rato, observada ao microscópio óptico. (em meio de cultura DMEM)		<ul style="list-style-type: none"> • Migração celular lenta a partir dos explantes (cerca de 15 dias); • Consequentemente, a cultura demorou a atingir a confluência desejada; • As células localizavam-se preferencialmente em torno dos explantes; • As células apresentaram uma morfologia característica;
		<ul style="list-style-type: none"> • Quando a cultura atingiu a confluência, algumas células apresentavam sinais de envelhecimento, principalmente junto dos explantes; • A identificação da população celular (anti-SMA-FITC e anti-FVIII), e a localização dos receptores de adenosina (anti-A_{2A}, anti-A_{2B} e anti-P2Y₁) foram realizadas por imunofluorescência indirecta:


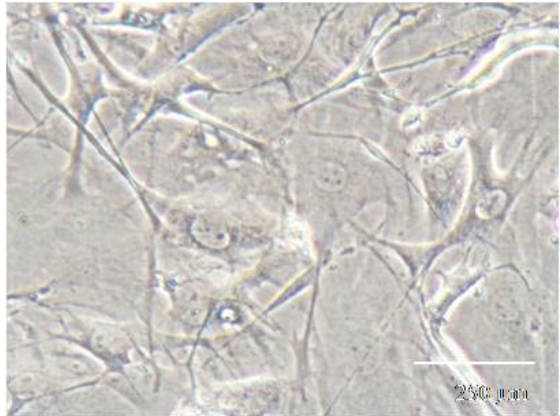
De acordo com os resultados obtidos, procedeu-se a modificações no protocolo de obtenção da cultura de células de músculo liso de tecido cavernoso: a técnica de explante foi substituída pela técnica de dissociação enzimática, na qual o tecido cavernoso humano foi digerido enzimaticamente com colagenase Tipo I(A) a 0,25 % em meio de cultura; outra alteração introduzida ao protocolo foi a substituição do meio de cultura DMEM por um meio nutricionalmente mais rico, o meio de cultura M199, suplementado com 20 % de SBF, 3,75 µg/mL de anfotericina B (250 µg/mL, Sigma), 150 IU/mL de penicilina, 150 µg/mL de estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000 µg/mL, Sigma) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma).

A cultura foi incubada a 37 °C em atmosfera húmida contendo 95 % de ar e 5 % de CO₂, e o meio de cultura foi mudado de 4 em 4 dias, mas apenas com SBF 10 %, 3,75 µg/mL de anfotericina B (250 µg/mL, Sigma), 150 IU/mL de penicilina, 150 µg/mL de estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000 µg/mL, Sigma) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma) até que cultura atinja confluência pretendida.

As alterações realizadas ao protocolo tiveram como objectivo aumentar a densidade celular num menor intervalo de tempo e melhorar a viabilidade das mesmas. Esta técnica foi utilizada para a cultura de tecido cavernoso humano e de rato.

Na tabela V apresentam-se os resultados obtidos na cultura de células de músculo liso de tecido cavernoso humano baseada no método de cultura modificado, descrevendo-se as características observadas nas culturas e mostrando as imagens representativas dessas mesmas características.

Tabela V: Morfologia das células de tecido cavernoso de humano cultivadas *in vitro*, em meio de cultura M199 e, descrição das características adquiridas pela cultura realizada pela técnica de dissociação, observada por microscopia óptica (escala 250 µm).

Tipo de Cultura	Imagem	Descrição dos Resultados
Cultura de células obtida pela <u>técnica de dissociação enzimática</u> , a partir de tecido cavernoso humano, observada ao microscópio óptico. (em meio de cultura M199)		<ul style="list-style-type: none"> • Presença de células em cultura em poucos dias (cerca de 5 dias); • Distribuição uniforme das células pela caixa de cultura; • Consequentemente, a confluência desejada foi atingida mais rapidamente (cerca de 12 dias), quando comparada com a técnica de explante;
		<ul style="list-style-type: none"> • As células apresentaram uma morfologia característica, sem sinais de envelhecimento; • A identificação da população celular (anti-SMA-FITC e anti-FVIII), e a localização dos receptores de adenosina (anti-A_{2A}, anti-A_{2B} e anti-P2Y₁) foram realizadas por imunofluorescência indirecta.

ii. Cultura de células endoteliais de tecido cavernoso

A literatura consultada refere que a cultura de células endoteliais requer a presença de factores de crescimento específicos. É, ainda, sugerido que a cultura de células endoteliais a partir de tecido cavernoso seja realizada pela técnica de dissociação enzimática, em meio de cultura ECGM, suplementado com SBF 5 %, 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, incubadas a 37 °C em atmosfera húmida contendo 5 % de CO₂ (Baev *et al.*, 1998; Pilatz *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007).

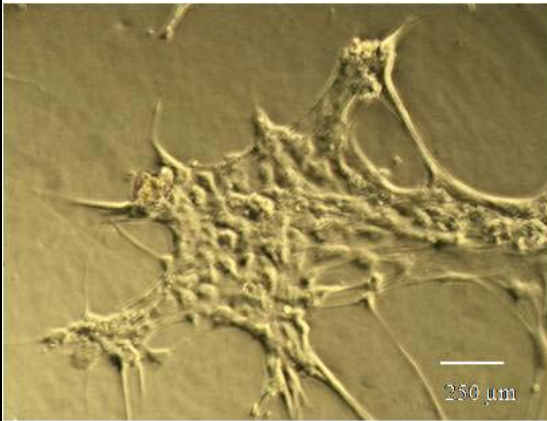
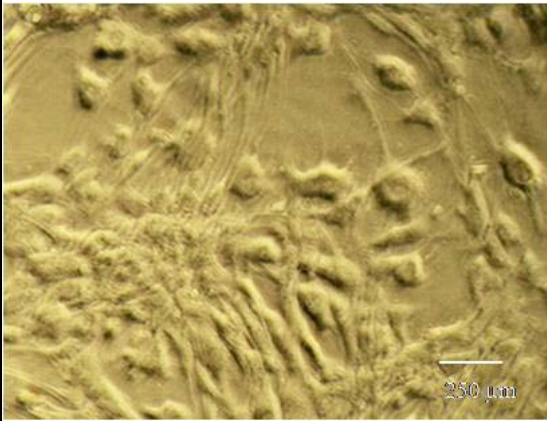
Este procedimento foi usado como base para obter células endoteliais de tecido cavernoso humano. No entanto, foram introduzidas pequenas alterações, nomeadamente o meio de cultura ECGM foi suplementado com SBF 5 % (Sigma), 3,75 µg/mL de anfotericina B (250 µg/mL, Sigma), 150 IU/mL de penicilina, 150 µg/mL de estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000 µg/mL, Sigma) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma).

A alteração da concentração dos suplementos para um valor mais concentrado teve como objectivo diminuir o número de contaminações nas culturas celulares. Dado que se utiliza soro animal, entre outros suplementos no meio de cultura, o risco de contaminação pela presença destes reagentes é acrescido.

Apesar do procedimento adoptado, algumas das culturas sofreram processos de contaminação bacteriana. A origem da contaminação não foi identificada, mas pode ter ocorrido por má execução técnica por parte do investigador ou, por falta de condições assépticas do equipamento, material e/ou reagentes. As culturas afectadas pela contaminação bacteriana foram devidamente descontaminadas e eliminadas.

Nas culturas seguintes reforçaram-se os cuidados e, aumentaram-se as concentrações dos antibióticos e do antimicótico. Os resultados da cultura de tecido cavernoso humano com o objectivo de obter células endoteliais a partir do protocolo modificado, encontra-se na Tabela VI. Nesta tabela é feita a descrição das características observadas na cultura e as imagens que mostram essas mesmas características.

Tabela VI: Morfologia das células de tecido cavernoso humano cultivadas *in vitro*, em meio de cultura ECGM, e descrição das características adquiridas pela cultura realizada pela técnica de dissociação enzimática, observadas por microscopia óptica (escala 250 µm).

Tipo de Cultura	Imagem	Descrição dos Resultados
Cultura de células obtida pela técnica de <u>dissociação enzimática</u> , a partir de tecido cavernoso humano, observada ao microscópio óptico. (em meio de cultura ECGM)		<ul style="list-style-type: none"> • As células apresentaram-se em cultura em poucos dias (cerca de 5 dias); • O padrão de crescimento celular foi diferente para os diferentes tipos de células presentes na cultura; • As células apresentaram uma morfologia característica; • A cultura de células endoteliais demora algum tempo a atingir a confluência (cerca de 15 dias), mesmo sendo realizada pela técnica de dissociação enzimática;
		<ul style="list-style-type: none"> • A identificação da população celular (anti-SMA-FITC e anti-FVIII), e a localização dos receptores de adenosina (anti-A_{2A}, anti-A_{2B} e anti-P2Y₁) foram realizadas por imunofluorescência indirecta:

iii. Caracterização das células do tecido cavernoso humano por imunofluorescência indirecta

A imunofluorescência indirecta permitiu caracterizar molecularmente as células obtidas na cultura celular a partir de tecido cavernoso e confirmar a sua identidade. Para identificar a presença de células de músculo liso nas culturas obtidas a partir do tecido cavernoso humano podem utilizar-se anticorpos específicos anti- α -actina e anti-miosina. A identificação das células endoteliais humanas é habitualmente feita através um anticorpo específico para células endoteliais, anti-factor de vonWillebrand (FVIII) (Pilatz *et al.*, 2005).

As células de tecido cavernoso de rato (Figura X) e humano (Figura XI), cultivadas em meio de cultura M199, revelaram uma marcação imunofluorescente positiva para o marcador de células musculares lisas, anti- α -actina (anti-msSMA-FITC). As culturas apresentavam outras células que não apresentaram imunorreactividade contra a α -actina, que foram detectadas pela marcação nuclear pelo DAPI. As células de músculo liso apresentavam um padrão estriado característico das fibras musculares lisas (marcação verde).

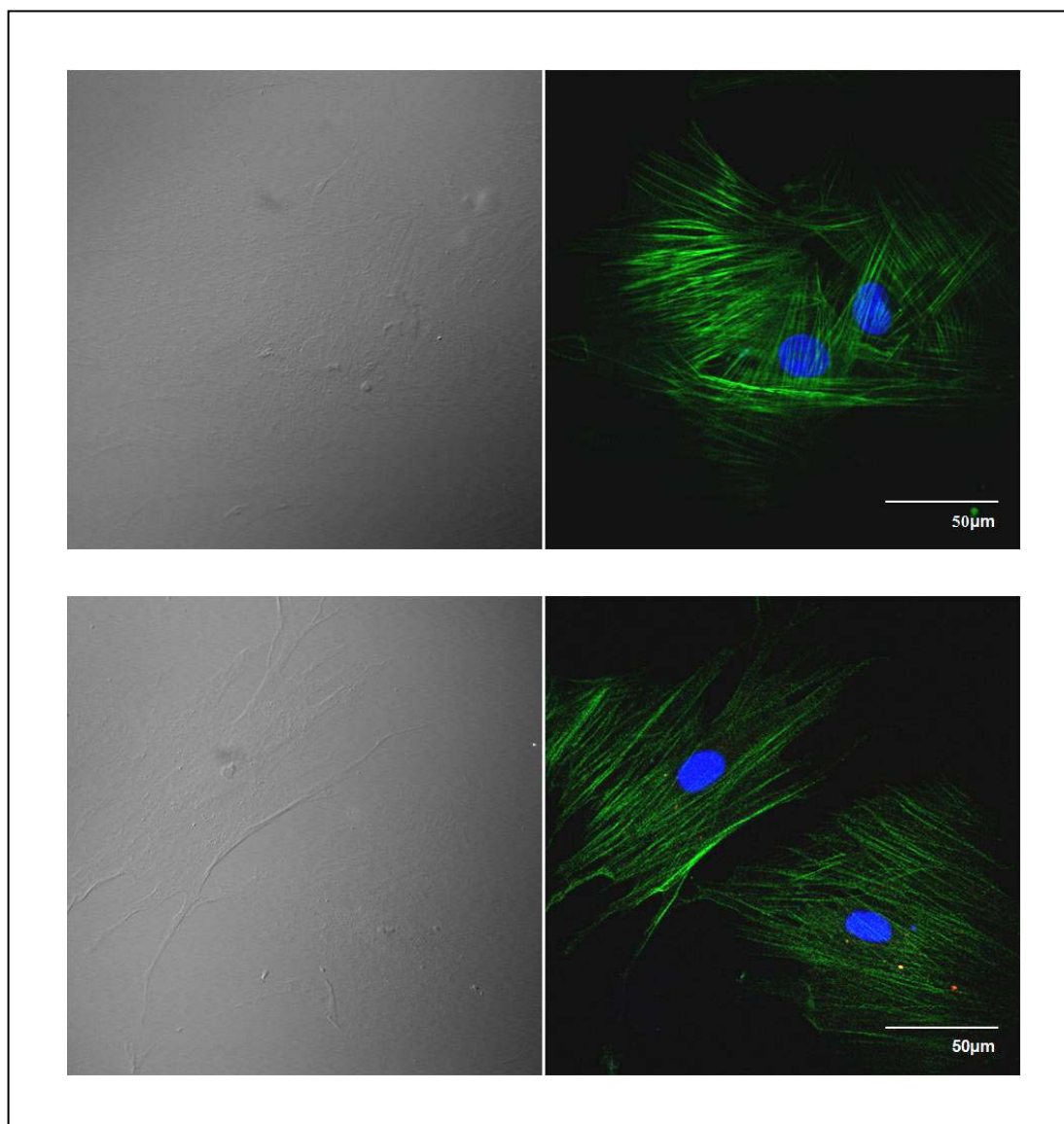


Figura X: Células de tecido cavernoso de rato marcadas com anticorpo específico anti-msSMA (verde) observadas por microscopia confocal (escala 50 µm).

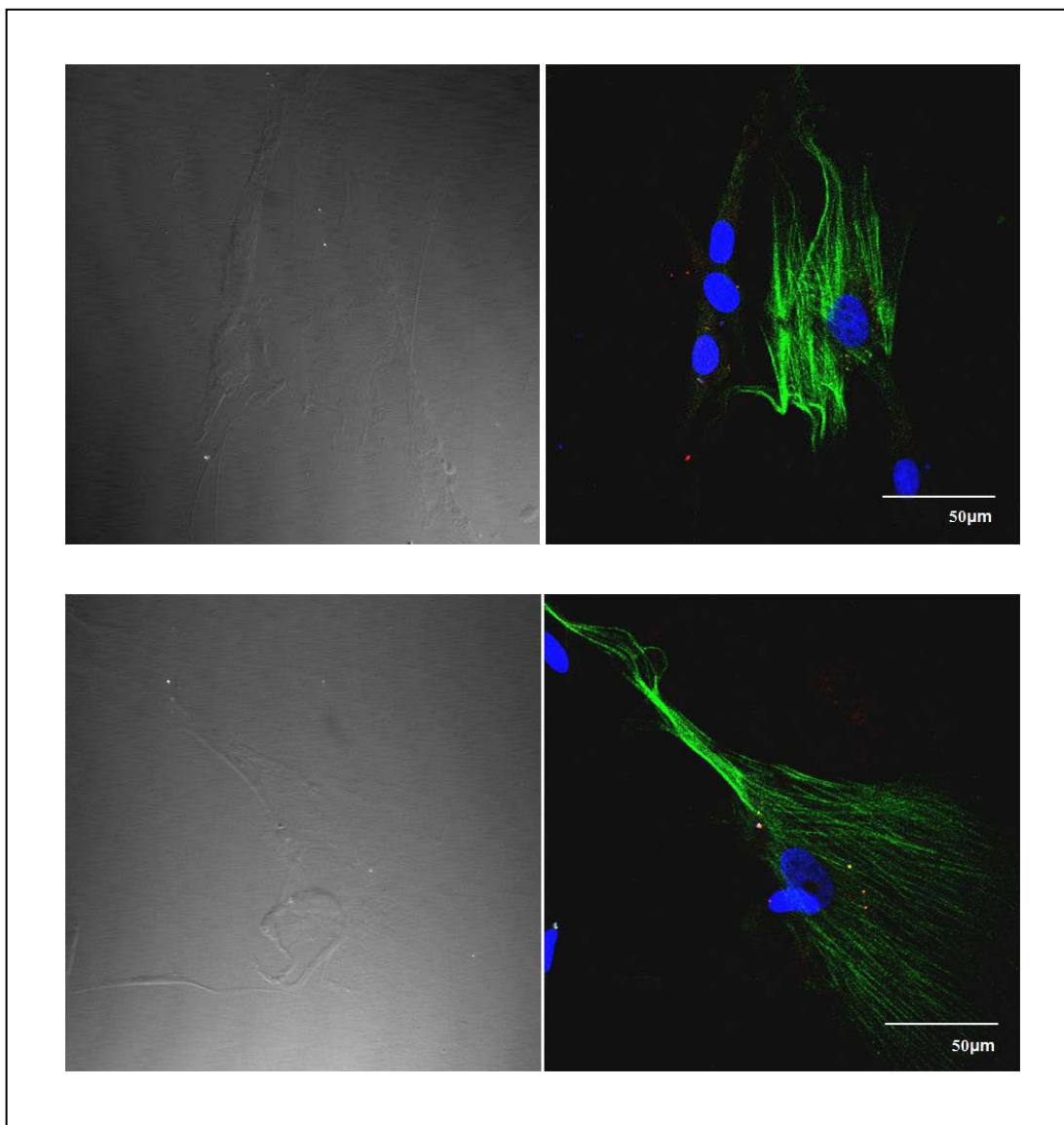


Figura XI: Células de tecido cavernoso de humano marcadas com anticorpo específico anti- α SMA (verde) observadas por microscopia confocal (escala 50µm).

As células obtidas a partir de culturas de tecido cavernoso humano em meio de cultura ECGM, foram identificadas por imunofluorescência como células endoteliais (Figura XII) através da marcação com o anticorpo anti-msFVIII. As culturas apresentavam outros tipos de células, não identificadas, detectadas pela marcação nuclear pelo DAPI. As células endoteliais em cultura encontravam-se em número reduzido, pois o seu crescimento e proliferação é muito mais lento do que outros tipos de células coexistentes (e.g. músculo liso, fibroblastos).

No entanto, a morfologia “em empedrado” (paralelepípedos) das células endoteliais em cultura, a marcação imunofluorescente “pontilhada” contra o factor VIII de von-Willebrand (marcação vermelha) e a tendência para que as células se arranjam em círculos fazendo lembrar vagamente a formação de vasos sanguíneos, permitiu a sua caracterização (Pilatz *et al.*, 2005).

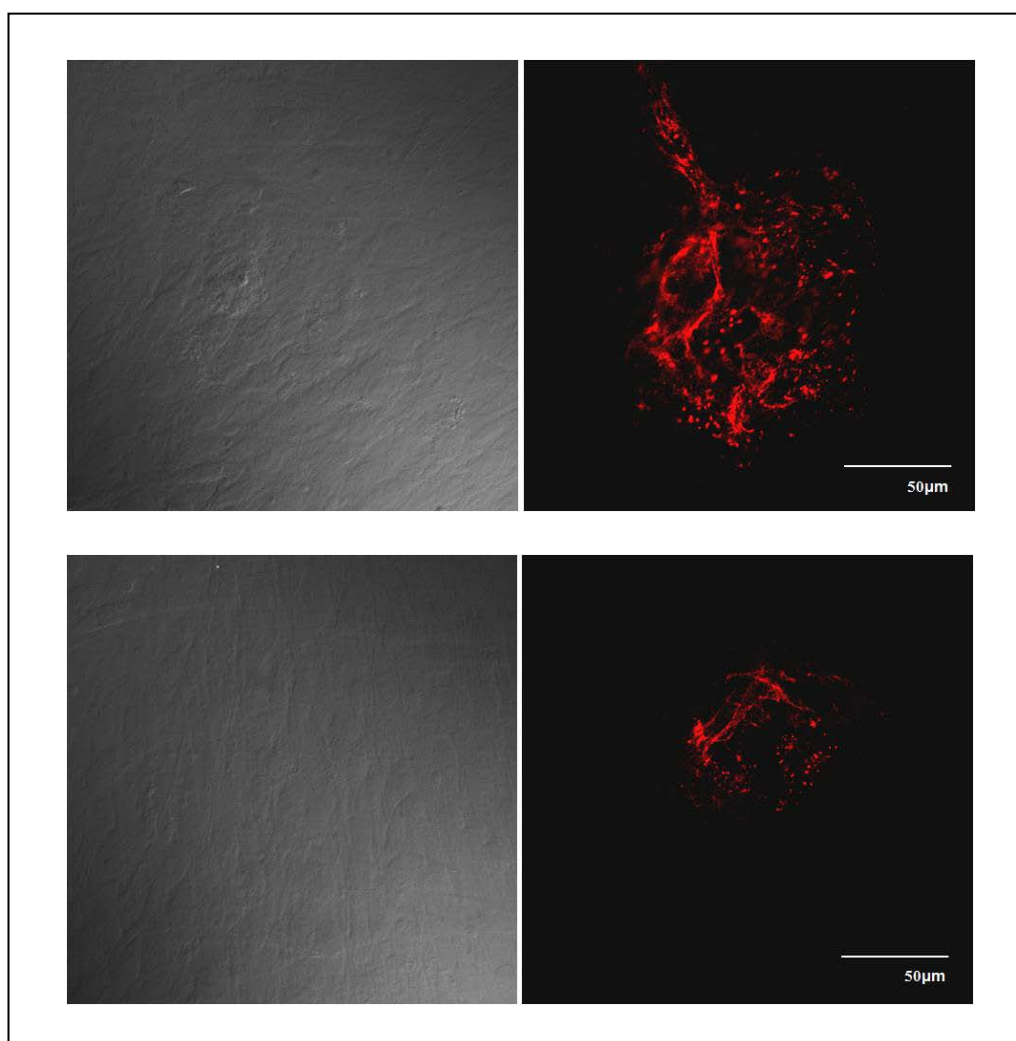


Figura XII: Células de tecido cavernoso humano marcadas com anticorpo específico anti-msFVIII (vermelho) observadas por microscopia confocal (escala 50µm).

Como já foi referido anteriormente, estudos preliminares demonstraram o importante papel da adenosina no relaxamento do tecido cavernoso humano e de rato, através da activação de receptores purinérgicos (Faria *et al.*, 2006). Daí a necessidade de avaliar a presença de alguns destes receptores nas células de tecido cavernoso, para que posteriormente se possam também realizar estudos de carácter funcional nestas células. Esta avaliação foi feita em experiências de imunofluorescência indirecta, utilizando-se anticorpos primários específicos contra estes receptores.

Estudos funcionais anteriores referem que receptores A_{2A} da adenosina parecem estar localizados nas células musculares lisas do tecido cavernoso humano e de rato onde são responsáveis pelo seu relaxamento. Ensaio de imunolocalização dos receptores A_{2A} (marcação vermelha) nas células de tecido cavernoso de rato provaram que estes receptores co-localizam com o marcador das fibras musculares lisas, anti-msSMA-FITC (marcação verde) (Figura XIII). As células de músculo liso apresentavam um padrão estriado (marcação verde) e os receptores A_{2A} apresentavam um padrão ‘pontilhado’ (marcação vermelha). Outros receptores da adenosina foram testados em células de tecido cavernoso humano e de rato, mas os resultados obtidos ainda carecem de confirmação.

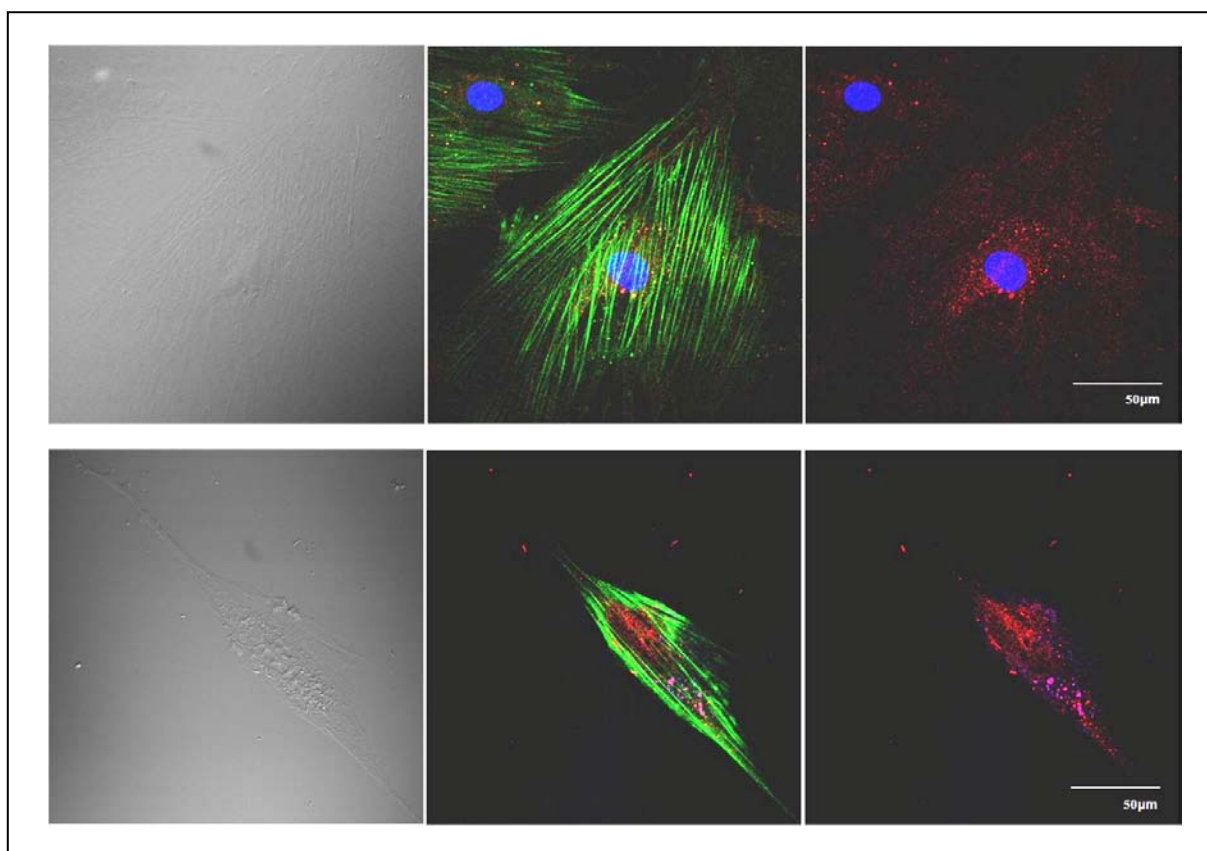


Figura XIII: Células de tecido cavernoso de rato marcadas com anticorpo específico anti-msSMA (verde) e com anticorpo contra os receptores A_{2A} (vermelho) observadas por microscopia confocal (escala 50µm).

Estudos com células de músculo liso de aorta de rato mostram que os receptores purinérgicos P2Y₁ sensíveis aos nucleótidos de adenina, nomeadamente ao ADP, parecem estar envolvidos no relaxamento vascular (Govindan *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram obtidos no cólon de rato comprovando a acção relaxante dos receptores P2Y₁ neste território (Grasa *et al.*, 2009). Resultados, ainda não publicados, obtidos do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP (Faria *et al.*, 2009, *Soc. Port. Farmacologia*), mostraram que o relaxamento do tecido cavernoso humano pode ser conseguido através da activação de receptores P2Y₁ sensíveis ao ADP, e que o efeito deste receptor pode tornar-se mais evidente em doentes diabéticos com disfunção erétil vasculogénica. Deste modo, pareceu-nos interessante avaliar a expressão deste subtipo de receptores nos miócitos de tecido cavernoso em cultura. Os resultados mostram a presença de imunoreactividade contra o receptor P2Y₁ nas células musculares lisas do tecido cavernoso humano (marcação vermelha) e a sua co-localização com o marcador específico destas células, anti-msSMA-FITC (marcação verde) (Figura XIV).

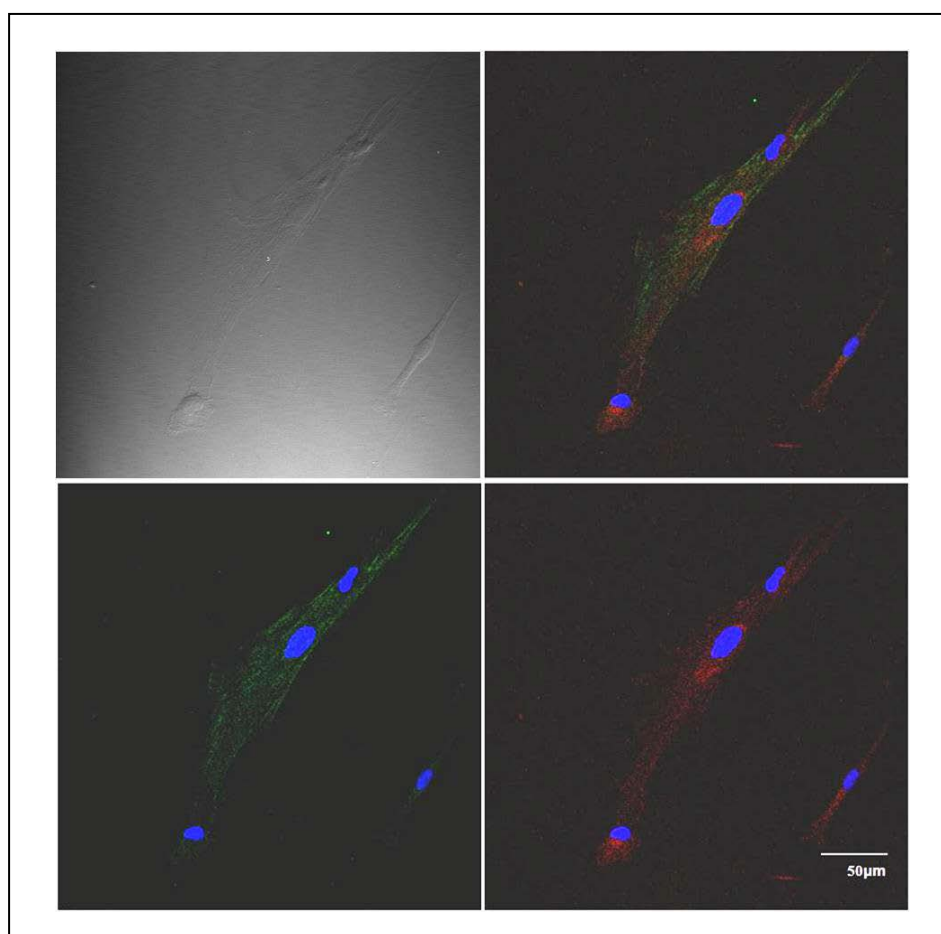


Figura XIV: Células de tecido cavernoso humano marcadas com anticorpo específico anti-msSMA (marcação verde) e com anticorpo específico contra os receptores P2Y₁ (marcação vermelha) observadas por microscopia confocal (escala 50µm).

Capítulo IV – Discussão

A cultura de células de tecido cavernoso tem sido utilizada em estudos de disfunção erétil, nomeadamente de origem vasculogénica. Porém, a realização destas culturas suscita algumas preocupações, sendo de destacar a qualidade e quantidade de células conseguidas em cultura. Além disto, também é necessário ter uma especial atenção o elevado nível de contaminações encontradas em culturas deste tecido.

Inúmeras controvérsias têm surgido relativamente ao método de cultura utilizado para a obtenção de células de músculo liso e células endoteliais de tecido cavernoso. Neste sentido foi nosso objectivo contribuir para a padronização da técnica de isolamento e caracterização destas células. Na literatura, são encontrados dois tipos de protocolos que diferem entre si essencialmente no tratamento inicial da amostra, mas que depois se revela um passo fundamental para a obtenção das células. As técnicas de cultura mais utilizadas são a técnica de explante, em que o tecido é colocado directamente nas placas de cultura, e a técnica de dissociação enzimática, em que o tecido começa por ser digerido enzimaticamente antes das células em suspensão serem colocadas nas placas de cultura (Pilatz *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2009).

A metodologia utilizada neste trabalho contribuiu, a par dos dados existentes na literatura, para o sucesso no estabelecimento do melhor protocolo a seguir quando se pretendem isolar e cultivar células de tecido cavernoso humano e de rato. Este trabalho propõe alterações aos protocolos existentes na literatura da especialidade, nomeadamente no que respeita ao tipo de técnica utilizada para a realização das culturas (explante *vs.* digestão enzimática) e ao tipo de meio de cultura empregue no cultivo de miócitos e/ou de células endoteliais do tecido cavernoso. Em nossa opinião, estas modificações são essenciais para garantir o rendimento do método de isolamento e a viabilidade das células em cultura do tecido cavernoso.

Relativamente às características das culturas celulares observaram-se diferenças entre as duas técnicas de cultura, nomeadamente quanto ao tempo de cultura, crescimento celular e viabilidade celular. Pela técnica de explante as células apresentaram uma morfologia característica de células de tecido cavernoso (Tabela IV). Observou-se, no entanto, que o crescimento e proliferação celular foi mais lento quando utilizada esta técnica em relação à técnica de dissociação enzimática. As células obtidas pela técnica do explante demonstravam sinais de envelhecimento em consequência do tempo necessário para que se atingisse o estado de confluência, que se reflectia no aumento do volume das

células e na presença de restos celulares, inclusive células mortas. Também durante a monitorização da evolução das culturas ao microscópio óptico se puderam observar algumas diferenças entre as duas técnicas. Pela técnica de dissociação enzimática, as células formam um ‘tapete’ homogêneo que se distribui uniformemente pela placa de cultura (tabela V e VI), consequência de um crescimento e proliferação celular mais rápido do que pela técnica de explante. Também, na técnica de dissociação enzimática o momento da tripsinização é definido pelo investigador atendendo ao grau de confluência desejado, já que as células apresentam viabilidade compatível. Contrariamente, na técnica de explante, muitas vezes o processo de tripsinização tem de ser antecipado devido aos sinais de envelhecimento precoces demonstrados na cultura.

Relativamente aos meios de cultura utilizados, é de realçar que o meio de cultura M199 é um meio mais rico em sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas, entre outros nutrientes, do que o meio de cultura DMEM, daí os melhores resultados obtidos com a utilização do primeiro no trabalho de isolamento e cultura de miócitos a partir do tecido cavernoso, tanto humano como de rato. Por outro lado, mostrou-se mais uma vez neste trabalho que as culturas de células endoteliais só são conseguidas utilizando um meio de cultura (ECGM) suplementado com factores de crescimento específicos para estas células.

O maior problema enfrentado neste estudo deveu-se à ocorrência frequente de contaminações bacterianas de origem desconhecida. Este facto contribuiu para atrasar a optimização da metodologia e a obtenção de resultados. É, no entanto, importante realçar que o método de colheita do tecido cavernoso a partir de dadores cadavéricos e o processo de transporte das amostras do bloco cirúrgico para o laboratório devem ser factores a considerar no futuro na análise da ocorrência das contaminações microbiológicas, para além da melhoria da técnica do investigador e dos cuidados com a assepsia de todo o equipamento, materiais e reagentes.

Neste trabalho utilizou-se a técnica de imunofluorescência indirecta para caracterizar fenotipicamente as células em cultura e a expressão de receptores purinérgicos nas mesmas. Dado tratarem-se de culturas heterogêneas, foi necessário utilizar anticorpos específicos contra determinados alvos moleculares característicos das células musculares lisas e endoteliais. Assim, para assegurar que as células observadas eram fibras musculares lisas, utilizou-se um anticorpo contra a α -actina (anti-msSMA-FITC). Observadas ao microscópio confocal, as células musculares lisas portadoras de imunofluorescência contra

α -actina apresentavam um padrão estriado de cor verde (Figuras X e XI). Relativamente à identificação das células endoteliais foi utilizado um anticorpo específico anti-msFVIII. Quando estas células foram observadas ao microscópio confocal apresentavam um padrão de fluorescência vermelho pontilhado (Figura XII). O facto de se terem obtido células endoteliais a partir de tecido cavernoso humano mostra o sucesso do protocolo utilizado, já que estas células são de difícil isolamento devido ao seu crescimento lento comparativamente com outras coexistentes (e.g. miócitos, fibroblastos).

Os resultados obtidos permitiram, ainda, demonstrar a coexistência de marcação específica contra células musculares lisas, o anticorpo contra α -actina (anti-msSMA-FITC), e contra os receptores A_{2A} da adenosina (Figura XIII) e $P2Y_1$ (Figura XIV). Este receptores apresentam um padrão pontilhado vermelho e uma distribuição maioritariamente na periferia das células que é característico de receptores de membrana celular, contrariamente ao padrão estriado da marcação citoplasmática contra a α -actina. Estes resultados mostram, pela primeira vez, a expressão dos receptores A_{2A} da adenosina e $P2Y_1$ em miócitos do tecido cavernoso humano e confirmam as suspeitas derivadas dos estudos funcionais realizadas no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP (Faria *et al*, 2006; 2009).

Conclusão

Em conclusão, neste estudo conseguiu-se estabelecer um protocolo simples e, que parece ser eficaz para o isolamento e cultura de células de tecido cavernoso humano e de rato. A técnica de dissociação enzimática revelou-se a técnica que apresentou melhores resultados, uma vez que permite obter culturas com uma distribuição celular mais uniforme e com um rendimento celular maior.

O controlo das contaminações bacterianas nas culturas foi uma das dificuldades a superar neste estudo, uma vez que a sua origem não foi identificada. Também a obtenção de tecido cavernoso, humano e de rato, foi uma barreira a ultrapassar, pois a quantidade de tecido conseguida era reduzida.

A caracterização fenotípica das células pela técnica de imunofluorescência indirecta permitiu confirmar a presença de células de músculo liso e células endoteliais nas culturas heterogéneas de tecido cavernoso. A localização dos receptores de adenosina também foi confirmada por imunofluorescência, nomeadamente a presença de receptores A_{2A} nas células de músculo liso.

Este trabalho é fundamental para o desenvolvimento de estudos celulares e moleculares que envolvam células de tecido cavernoso, para avaliação da actividade dos receptores de adenosina na disfunção erétil vasculogénica, dado que estes receptores estão envolvidos nos mecanismos de regulação do tónus vascular e muscular do tecido cavernoso.

1. Perspectivas Futuras

Com o intuito de dar continuidade a este trabalho pretende-se: (1) confirmar os resultados obtidos neste estudo; (2) identificar outros receptores de adenosina, eventualmente expressos em células tecido cavernoso controlo; (3) identificar receptores de adenosina em células de tecido cavernoso de doentes com disfunção erétil vasculogénica.

Sabe-se, que a alteração dos níveis intracelulares de Ca^{2+} é o mecanismo principal através do qual a tensão é regulada na fibra muscular lisa. Além disso, as acções de vários transmissores e fármacos que afectam a tensão do músculo liso são mediadas por modificações dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Estão programados ensaios com células de tecido cavernoso para avaliar a dinâmica do Ca^{2+} intracelular em célula única por microscopia com sonda fluorescente (Fura-2 AM).

Investigar-se-á, ainda a breve prazo, o papel dos agonistas e antagonistas selectivos dos receptores da adenosina na proliferação e diferenciação das células endoteliais e dos miócitos em cultura, avaliando a síntese de DNA (por incorporação de [^3H]-timidina) e a viabilidade/proliferação celular (kit Live/Dead, método MTT, produção de ATP por bioluminescência).

Referências Bibliográficas

- Albersen M, Lin G, Fandel TM, Zhang H, Qiu X, Lin C-S & Lue TF. (2011). "Functional, Metabolic, and Morphologic Characteristics of a Novel Rat Model of Type 2 Diabetes-associated Erectile Dysfunction". *Journal of Urology*. 78:476.e1-476.e8.
- Andersson KE & Wagner G. (1995). "Physiology of penile erection". *Physiological Reviews*. 75:191-236.
- Andersson KE. (2001). "Pharmacology of penile erection". *Pharmacology Reviews*. 53:417-450.
- Baev NI, Awad IA & Macdonald RL. (1998). "Endothelial Cell Culture From Human Cerebral Cavernous Malformations". *Journal of the American Heart Association*. 29:2426-2434.
- Bosch RJ, Benard F, Aboseif SR *et al.* (1991). "Penile detumescence: characterization of three phases". *Journal of Urology*. 146: 867.
- Burnett AL. (1995). "Role of nitric oxide in the physiology of erection". *Biology of Reproduction*. 52:485-489.
- Burnett AL. (1997). "Nitric oxide in the penis: Physiology and pathology". *Journal of Urology*. 157:320–324.
- Burnstock G & Kennedy C. (1985). "Is there a basis for distinguishing two types of P2 purinoceptor?" *General Pharmacology*. 16:433-440.
- Burnstock G. (1978). "A bases for distinguishing two types of purinergic receptor. (Straub RW & Bolis L, eds) In Cell Membrane Receptor for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach". *New York: Raven Press*. 107-118.
- Burnstock G. (2006a). "Historical review: ATP as a neurotransmitter". *Trends in Pharmacological Sciences*. 27(3):166-176.
- Burnstock G. (2006b). "Pathophysiology and Therapeutic Potential of Purinergic Signaling". *Pharmacological Reviews*. 58:58-86.
- Castillo CA, Albasanz JL, Fernández M & Martin M. (2007). "Endogenous Expression of Adenosine A1, A2 and A3 Receptors in Rat C6 Glioma Cells". *Neurochemical Research*. 32:1056-1070.
- Chitaley K. (2009). "Type 1 and type 2 diabetic-erectile dysfunction: same diagnosis (ICD-9), different disease?" *Journal of Sexual Medicine*. 6(Suppl 3): 262-268.
- Christ GJ, Lerner SE, Kim DC, Melman A. (1995). "Endothelin-1 as a putative modulator of erectile dysfunction: I. Characteristics of contraction of isolated corporal tissue strips". *Journal of Urology*. 153: 1998-2003.
- Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T & Thompson LF. (2006). "Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73)". *Purinergic Signal*. 2:351–60.
- Collis MG & Hourani SMO. (1993). "Adenosine receptor subtypes". *Trends in Pharmacological Sciences*. 14:360-366.
- Cunha RA. (2001). "Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors". *Neurochemistry International*. 38:107-125.
- Dean RC & Lue TF. (2005). "Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction". *Urologic Clinics of North America*. 32:379.

- Dubey RK, Gillespie DG, Shue H & Jackson EK. (2000). "A2B receptors mediate antimitogenesis in vascular smooth muscle cells". *Hypertension-Journal of the American Heart Association*. 35:267-272.
- Erlinge D & Burnstock G. (2008). "P2 receptors in cardiovascular regulation and disease". *Purinergic Signal*. 4:1-20.
- Faria M, Magalhães-Cardoso T, Lafuente-de-Carvalho J-M & Correia-de-Sá P. (2006). "Corpus Cavernosum from Men with Vasculogenic Impotence is Partially Resistant to Adenosine Relaxation due to Endothelial A_{2B} Receptor Dysfunction". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 319:405-413.
- Fox IH & Kelley WN. (1978). "The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells". *Annual Review of Biochemistry*. 47:655-686.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN & Linden J. (2001). "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors" *Pharmacology Reviews* 53:527-552.
- Fredholm BB. (2007). "Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair". *Cell Death Differ*. 14:1315-23.
- Freshney RI. (2006). "Basic Principles of Cell Culture". *John Wiley & Sons, Inc*. I:3-22.
- Galiano M, Pignot G, Costa C, Vallanuen G & Virag R. (2010). "Erectile dysfunction and cavernosal endothelial cells". *Progrés en Urologie*. 20(3):188-193.
- Giugliano F, Maiorino M, Bellastella G, *et al.* (2010). "Determinants of erectile dysfunction in type 2 diabetes". *International Journal of Impotence Research*. 22(3): 204-209.
- Govindan S, Taylor EJA & Taylor CW. (2010). "Ca²⁺ signalling by P2Y receptors in cultured rat aortic smooth muscle cells". *British Journal of Pharmacology*. 160:1953-1962.
- Grant MB, Tarnuzzer RW, Caballero S, Ozeck MJ, Davis MI, Spoerri PE, Feoktistov I, Biaggioni I, Shryock JC & Bilardinelli L. (1999). "Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells". *Circulation Research- Journal of American Heart Association*. 85:699-706.
- Grasa L, Gil V, Gallego D, Martín MT & Jiménez M. (2009). "P2Y1 receptors mediate inhibitory neuromuscular transmission in the rat colon". *British Journal of Pharmacology*. 158:1641-1652.
- Halls J, Bydawell G & Patel U. (2009). "Erectile dysfunction: the role of penile Doppler ultrasound in diagnosis". *Abdominal Imaging*. 34:712-725.
- Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G & Lewis D. (2002). "Good Cell Culture Practice". *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*. 30:407-414.
- Hirshkowitz M, Karacan I, Howell JW, Arcasoy MO, Williams RL. (1992). "Nocturnal penile tumescence in cigarette smokers with erectile dysfunction". *Urology*. 39(2), 101-107.
- Hsu GL, Hsieh CH, Wen HS, Hsu WL, Wu CH, Fong TH, Chen SC & Tseng GF. (2004). "Anatomy of human penis: the relationship of the architectures between skeletal and smooth muscles". *Journal of Andrology*. 25:426-431.
- Jesmin S, Sakuma I, Salah-Eldin A, *et al.* (2003). "Diminished penile expression of vascular endothelial growth factor and its receptors at the insulin-resistant stage of a type II diabetic rat model: a possible cause for erectile dysfunction in diabetes". *Journal of Molecular Endocrinology*. 31(3):401-418.

- Kredich NM & Hershfield MS. (1980). "Perturbations in S-Adenosylhomocysteine and S-Adenosylmethionine metabolism: Effects on transmethylation". *Advances in Enzyme Regulation*. 18:181-191.
- Lue TF. (2000). "Erectile Dysfunction". *New England Journal of Medicine*. 342:1802.
- Martinez-Salamanca JI, Martinez-Ballesteros C, Portillo L, Gabancho S, Moncada I & Carballido J. (2010). "Physiology of Erection". *Archivos Españoles de Urología*. 63(8):581-588.
- Mas M. (2010). "Molecular Mechanisms of Penile Erection". *Archivos Españoles de Urología*. 63(8):589-598
- Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, et al. (2005). "Association between erectile dysfunction and coronary artery disease: a case report study". *Journal of Sexual Medicine*. 2:575-82.
- Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, et al. (2006). "Association between erectile dysfunction and coronary artery disease: role of coronary clinical presentation and extent of coronary vessels involvement: the COBRA trial". *European Heart Journal*. 27:2632-9.
- NIH Consensus Conference. (1993). "Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence". *JAMA*. 270(1):83-90.
- Odriozola AA, Quintanilla MG, Arias JGP, Tamayo AL & González GI. (2010). "Disfunción Eréctil de Origen Vascular". *Archivos Españoles de Urología*. 63(8):611-620.
- Pilatz A, Schultheiss D, Gabouev AI, Schlote N, Mertsching H, Jonas U & Stief CG. (2005). "Isolation of Primary Endothelial and Stromal Cell Cultures of the Corpus Cavernosum Penis for Basic Research and Tissue Engineering". *European Urology*. 47:710-719.
- Ralevic V & Burnstock G. (1998). "Receptors for purines and pyrimidines". *Pharmacology Reviews*. 50:413-492.
- Ritchie R & Sullivan M. (2011). "Endothelins & erectile dysfunction". *Pharmacological Research*. 63:496-501.
- Ryan JA. (2008). "Introduction to Animal Cell Culture. Technical Bulletin". *Corning Incorporated*.
- Santamaría FC. (2010). "Aspectos Psicosociales del Manejo de la Disfunción Eréctil. Hábitos Tóxicos y Estilo de Vida. La Pareja en la Disfunción Eréctil. Psicoterapia y Terapia de Pareja". *Archivos Españoles de Urología*. 63(8):693-702.
- Sexl *et al.* (1995). "Stimulation of human umbilical vein endothelial cell proliferation by A2-adenosine and alfa2-adrenoceptors". *Br. J. Pharmacol.* 114:1577-1586.
- Simosen, U., Prieto, D., Delgado, J. A., Hernández, M., Resel, L., Saenz de Tejada, I. & García-Sacristán, A. (1997). "Nitric oxide is involved in the inhibitory neurotransmission and endothelium-dependent relaxations of human small penile arteries". *Clinical Science (London, England:1979)*. 92(3):269-275.
- Sommer F & Schulze W. (2005). "Treating erectile dysfunction by endothelial rehabilitation with phosphodiesterase 5 inhibitors". *World Journal of Urology*. 23:385-392.
- Song Y, Mehta N, Sheh B, Saljooque F, Sang UH & Rajasekaran M. (2008). "Transdifferentiation of rat fetal brain stem cells into penile smooth muscle cells". *BJU International*. 104:257-262.
- Steenberg WV. (1993). "Alcohol, liver cirrhosis and disorders in sex hormone metabolism". *Acta Clínica Bélgica*. 48(4): 269-283.
- Stone TW. (1985). "Purines: Pharmacology and Physiological Roles". *MacMillan*, London.

- Tejada IS, Angulo J, Cellek S, Gonzalez-Cadavid N, Heaton J, Pickard R, Simonsen U. (2004). "Physiology of erectile function". *Journal of Sexual Medicine*. 1:254–265.
- Tejada IS. (2002). "Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contractility". *International Journal of Impotence Research*. 14:s6-s10.
- Terradas C, Levalle O, Nagelberg A & Mormandi E. (2001). "Sildenafil improves nocturnal penile erections in organic impotence". *International Journal of Impotence Research*. 13(2):125–129.
- Thorve VS, Kshirsagara AD, Vyawaharea NS, Joshib VS, Ingalea KG & Mohitea RJ. (2011). "Diabetes-induced erectile dysfunction: epidemiology, pathophysiology and management". *Journal of Diabetes and Its Complications*. 25:129-136.
- Vardi Y, Dayan L, Apple B, Gruenwald I, Ofer Y & Jacob G. (2009). "Penile and Systemic Endothelial Function in Men with and without Erectile Dysfunction". *European Urology*. 55:979-985.
- Villa G, Fumagalli M, Verderio C, Abbracchio MP & Ceruti S. (2010). "Expression and contribution of satellite glial cells purinoceptors to pain transmission in sensory ganglia: an update". *Neuron Glia Biology*. 6(1):31-42.
- Wagner G & Mulhall J. (2001). "Pathophysiology and diagnosis of male erectile dysfunction". *British Journal of Urology International*. 88(Suppl.3):3-10.
- Watras JM. (2009) "Músculo liso". Koeppen BM, Stanton BA. eds. *Berne y Levy Fisiología*. 6ª Ed. 268-85. Barcelona: Elsevier España.
- Yaar R, Jones MR, Chen J-F & Ravid K. (2005). "Animal Models for the Study of Adenosine Receptor Function". *Journal of Cellular Physiology*. 202:9-20.
- Zhao Y, Tan Y-Z, Zhou L-F, Wang H-J & Mao Y. (2007). "Morphological Observation and In Vitro Angiogenesis Assay of Endothelial Cells. Isolated From Human Cerebral Cavernous Malformations". *Journal of the American Heart Association*. 38:1313-1319.

